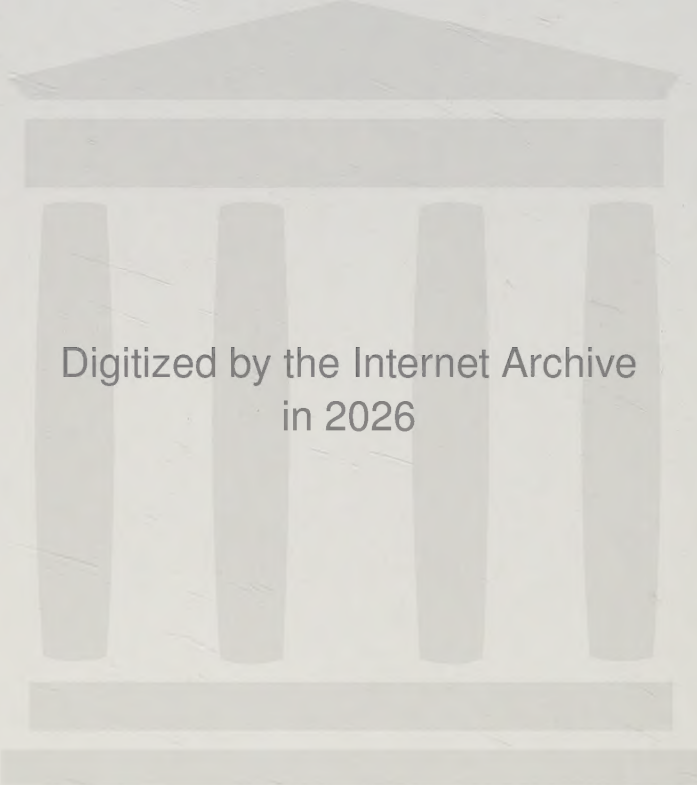


KLONIERUNG
UND CHARAKTERISIERUNG
VON cDNA FÜR DAS HÄMOCYANIN
DER VOGELSPINNE
EURYPELMA CALIFORNICUM

Renate Voit

Disbui. München

1987



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554822_0083

KLONIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON
cDNA FÜR DAS HÄMOCYANIN
DER VOGELSPINNE EURYPELMA CALIFORNICUM

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Fakultät für Biologie
der
Ludwig - Maximilians - Universität
München

vorgelegt von Renate Voit
aus Fichtelberg

November 1987

1. Gutachter: Prof. Dr. Bernt Linzen
2. Gutachter: Priv. Doz. Dr. Hans-Jürgen Schneider

Tag der mündlichen Prüfung: 15.12.1987

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde am Zoologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Bernt Linzen durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Bernt Linzen für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und sein stetes Interesse an meiner Arbeit. Besonders herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Bernt Linzen dafür, daß er nach dem Weggang meines Betreuers, Herrn Priv. Doz. Dr. Hans-Jürgen Schneider, selbst die Betreuung dieser Arbeit in sehr engagierter Weise übernahm.

Herrn Priv. Doz. Dr. Hans-Jürgen Schneider verdanke ich Idee und Themenstellung der Arbeit.

Weiterhin bedanken darf ich mich bei Herrn Prof. Dr. Ernst-Ludwig Winnacker, der mir ermöglichte, einige grundlegende molekularbiologische Techniken in seinem Labor zu erlernen. Mein Dank gilt hierbei besonders Frau Dr. Angelika Huber und Frau Dipl.-Biol. Gudrun Kausel.

Für die Synthese der Oligonukleotidproben bedanke ich mich bei Herrn Dr. Thomas Dörper (Abt. Prof. Winnacker), sowie Herrn Dr. Ronald Mertz und Frau Dorit Weigand (Genzentrum München), für die Computerauswertung der Sequenzdaten bei Herrn Dr. Michael Duchêne (Genzentrum München).

Für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die zum Gelingen einer solchen Arbeit nicht unwesentlich beiträgt, möchte ich mich herzlich bei allen Mitarbeitern bedanken. Ganz besonders hervorheben möchte ich jedoch die jederzeit überaus konstruktive und stimulierende Zusammenarbeit mit Frau Gertraud Feldmaier-Fuchs und Herrn Wolfgang Voll.

INHALTSVERZEICHNIS

A. EINLEITUNG	1
B. MATERIAL UND METHODEN	6
I. Materialien	
1. Chemikalien	6
2. Materialien für die Molekularbiologie	6
3. Radioaktive Substanzen	8
4. Bakterienstämme, Phagen und Plasmide	8
5. Medien für die Bakterien- und Phagenkulturen	9
6. Häufig verwendete Puffer und Lösungen	11
II. Methoden	
1. Tiere, Tierhaltung und Herzpräparation	12
2. Ständig verwendete Routinemethoden	
2.1. Sterilisation	13
2.2. Proteinbestimmung	13
2.3. DNA-Bestimmung	13
2.4. RNA-Bestimmung und UV-Spektren	13
2.5. Extraktion mit Phenol und Chloroform	14
2.6. Alkoholfällung von Nukleinsäuren	14
3. Isolierung von RNA	14
4. In vitro Translation von RNA und Immunpräzipitation	
4.1. In vitro Translationsansatz	15
4.2. Immunpräzipitation	16
4.3. Analytische SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	17
5. RNA-Agarosegel-Elektrophorese und Northernblotting	18
6. cDNA-Synthese	
6.1. Synthese des ersten cDNA-Stranges	19
6.2. Alkalische Agarosegel-Elektrophorese	21
6.3. Synthese des zweiten cDNA-Stranges	21
6.4. Homopolymeres Tailing der cDNA	22
7. Klonierung von cDNA in Plasmide	
7.1. Homopolymeres Tailing von pUC-Vektor-DNA	23
7.2. Annealing von cDNA und Vektor-DNA	23
7.3. Transformationsprotokoll für E. coli DH1 und DH5 α - Zellen	24
8. Isolierung von Plasmid-DNA	
8.1. Minilyse	26
8.2. Großansatz	27
9. Restriktionsspaltungen, DNA-Gele und Southernblotting	
9.1. Restriktionsspaltungen und Dephosphorylierung	29
9.2. Agarosegele	29

9.3. Polyacrylamidgele	30
9.4. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Gelen	30
9.5. Southernblotting	31
10. Radioaktive Markierung der DNA	
10.1. Nick-Translation	32
10.2. Endmarkierung von synthetischen Oligonukleotiden	33
11. Screening von cDNA-Genbanken	
11.1. Koloniefixierung auf Nitrocellulosefiltern	34
11.2. Koloniehybridisierung	35
11.3. Reinigung positiver Klone	37
12. Hybridisierung von Southern- und Northern-Blots	
12.1. Hybridisierung mit nick-translatierter Proben-DNA	37
12.2. Hybridisierung mit Oligonukleotidproben	38
13. Subklonierung in M13-Phagen	
13.1. Subklonierung	38
13.2. Isolierung von M13-Phagen-Einzelstrang-DNA	40
14. Subklonierung in pUC-Plasmiden	40
15. Konstruktion von Deletionsmutanten mit Exonuklease III/VII	41
16. DNA-Sequenzierungsmethoden	
16.1. Plasmid-Sequenzierung nach der Dideoxymethode	42
16.2. Sequenzierung in M13-Vektoren nach der Dideoxymethode	43
16.3. Sequenzierungsreaktionen	44
16.4. Sequenzgele	45
C. ERGEBNISSE	46
I. Nachweis der Hämocyaninbiosynthese im Herzgewebe durch in vitro-Translation isolierter RNA	
1. Kenntnisstand zum Biosyntheseort	46
2. Bisherige Befunde	46
3. Isolierung von RNA mittels der Guanidiniumisothiocyanat- Cäsiumchlorid-Methode	47
4. In vitro-Translation isolierter Herzgewebe-RNA in Kaninchenreticulocyten-Lysaten	48
5. Immunologische Analyse der Translationsprodukte	49
II. Erstellung gewebsspezifischer cDNA-Genbanken	54
1. Prinzip der Konstruktion von cDNA-Genbanken und Klonie- rungsstrategie	54
2. Synthese doppelsträngiger cDNA und Behandlung mit Terminaler Transferase	56
3. cDNA-Klonierungen, Klonierungseffizienzen und Background der Genbanken	60

III. Isolierung und Charakterisierung eines Hämocyanin-cDNA-Klons aus Genbank I	
1. Strategie zum Auffinden von Hämocyanin-cDNA-Klonen	66
2. Screening der cDNA-Klone der Genbank I mit "Kupfer A"-Oligonukleotidprobe	68
3. Restriktionskartierung des Klons pHc4	69
4. Subklonierung der cDNA des Klons pHc4 in M13-DNA	73
5. Sequenzanalyse der cDNA des Klons pHc4	75
IV. Hämocyanin-mRNA: Northernblotting und Hybridisierung mit Hc-cDNA pHc4	83
V. Isolierung und Charakterisierung weiterer Hämocyanin-cDNA-Klone	
1. Screening der Genbank II mit "Kupfer A"-Oligonukleotidprobe	85
2. Screening der cDNA-Genbanken III und IV mit pHc4-cDNA	86
3. Charakterisierung und Sequenzanalyse von Hämocyanin-cDNA-Klonen aus den Genbanken III und IV	91
3.1. Southern Blot-Analyse positiver Klone	91
3.2. Prinzip der Konstruktion von Deletionsmutanten mit Exonukleasen III/VII und Plasmidsequenzierung	94
3.3. cDNA-Klon pHc393	98
3.4. cDNA-Klone pHc450 und pHCC5	103
4. Hybridisierung unter mäßig stringenten Bedingungen	105
5. Screening von cDNA-Klonen mit "Kupfer B"-Oligonukleotidprobe	107
VI. Zusammenfassende Darstellungen zu den Ergebnissen der Klonierung und Sequenzierung von Hämocyanin-cDNA	111
D. DISKUSSION	116
1. Der Biosyntheseort von Hämocyanin bei der Vogelspinne <i>Eurypelma californicum</i>	117
2. Vergleich der Hämocyaninbiosyntheseorte verschiedener Vertreter von Arthropoden und Mollusken	119
Histologische Daten	119
Expression von Hämocyanin-mRNA in zellfreien Systemen und <i>Xenopus</i> -Oozyten	122
3. Strategie: cDNA-Synthese, Klonierung und Identifizierung von Hämocyanin-Klonen	126
Strategie des Screening	128
Überlegungen zur künftigen Strategie	129
Vergleich mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen	131
4. Vergleich der cDNA- und Proteinsequenz der Untereinheit <u>e</u> des Hämocyanins von <i>Eurypelma californicum</i>	133

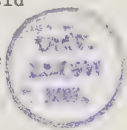
5. Charakteristika der cDNA-Sequenz	137
E. ZUSAMMENFASSUNG	144
F. ANHANG	146
G. LITERATUR	149

ABKÜRZUNGEN

Aminosäuren

A Alanin	M Methionin
C Cystein	N Asparagin
D Asparaginsäure	P Prolin
E Glutaminsäure	Q Glutamin
F Phenylalanin	R Arginin
G Glycin	S Serin
H Histidin	T Threonin
I Isoleucin	V Valin
K Lysin	W Tryptophan
L Leucin	Y Tyrosin

Ag	Antigen
Ak	Antikörper
amp	Ampicillin
AMV	Avian Myeloblastosis Virus
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
b	Basen
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre DNA
cpm	Zählimpulse pro Minute
D	Dalton
dA (C,G,T) TP	Deoxyadenosin (-cytidin,-guanosin,-thymidin)-5'-Triphosphat
ddA (C,G,T) TP	Dideoxyadenosin (-cytidin,-guanosin,-thymidin)-5'-Triphosphat
dNTP	Deoxynukleotid-5'-Triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)N,N'-tetraacetat
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
Hc	Hämocyanin
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
M	Molarität
MCS	Multiple-cloning-site
mRNA	messenger RNA
NC	Nitrocellulose
O.D.	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese



PEG	Polyethylenglykol
PER	Ammoniumpersulfat
poly(A) ⁺ -RNA	polyadenylierte RNA
PPO	2,5-Diphenyloxazol
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
ss	einzelsträngig
TCA	Trichloressigsäure
tet	Tetracyclin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Triton x-100	Cetylphenoxypolyethoxyethanol
tRNA	transfer RNA
U	Enzymeinheiten
UE	Untereinheit
VT	Volumenteil
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-indolyl-D-galaktosid

A. EINLEITUNG

Als vor etwa 2 Milliarden Jahren sich allmählich Sauerstoff in der Atmosphäre anreicherte, führte dies zu einem komplexen Umbruch in der Evolution des Lebens auf der Erde. Mit der Freisetzung von O_2 aus Photosyntheseprozessen konnte sich über weitere Millionen Jahre hinweg allmählich eine Ozonschutzschicht um die Erde aufbauen, die wiederum den Lebewesen mit ihren gegen kurzwellige Strahlung empfindlichen Strukturen den Übergang vom Wasser zum Land vor etwa 450 Millionen Jahren ermöglichte (SCHOPF, 1978). Mechanismen der aeroben Energiegewinnung wurden entwickelt. Die effektivere Umsetzung von Nahrungsressourcen in Zellenergieäquivalente (ATP) bei der aeroben Atmung gegenüber anaeroben Gärungsprozessen schließlich führte zur Dominanz aerob lebender Pro- und Eukaryonten, aus denen sich letztlich vor 500 bis 50 Millionen Jahren über die Differenzierung von Organen und Geweben die Evolution zu den komplex organisierten Invertebraten vollzog.

In höher organisierten Lebewesen reicht die bloße Diffusion des Sauerstoffs meist nicht mehr zur Versorgung aller Zellen aus. Die Evolution hat daher verschiedene oligomere Metalloproteine hervorgebracht, die als molekulare Sauerstoffträger den Sauerstofftransport in den Körperflüssigkeiten zu den Zellen übernehmen. Während bei allen Wirbeltieren das in den Erythrozyten konzentrierte, eisenhaltige Hämoglobin als Atmungspigment fungiert, trifft man bei Invertebraten auf ein breites Spektrum an Sauerstofftransportproteinen: **Hämerythrine** bei Brachiopoden, Polychäten, Priapuliden und Sipunculiden, **Chlorocruorine** in mehreren Polychätenfamilien und hochmolekulare **Hämoglobine** verstreut bei verschiedenen Vertretern der Invertebraten. Alle genannten Atmungsproteine binden Sauerstoff reversibel über Eisenatome, sie liegen zellulär (Hämerythrin, Hämoglobin) oder extrazellulär (Hämoglobin, Chlorocruorin) vor.

Hämocyane hingegen besitzen Kupferatome als Cofaktoren zur Sauerstoffbindung. Sie wurden bislang bei einer Vielzahl von Vertretern der Arthropoden und Mollusken nachgewiesen. Im Stamm der Arthropoda trifft man sie bei den Merostomata, Arachnida, Crustacea und Myriapoda an, innerhalb des Molluskenstammes in den Klassen Amphineura, Gastropoda, Cephalopoda (Review: ELLERTON et al., 1983); vor kurzem wurde Hämocyanin auch bei einem Vertreter der Bivalvia entdeckt (MORSE et al., 1986). Die frei in der Hämolymphe zirkulierenden Hämocyane sind hochmolekulare Aggregate aus heterogenen Monomeren. Hinsichtlich des Molekülaufbaus weisen Arthropoden- und Molluskenhämocyane erhebliche Unterschiede auf: Beim Molluskenhämocyanin-Typ aggregieren 10 oder 20 Untereinheiten miteinander zu einer Zylinderstruktur. Jede der Untereinheiten repräsentiert eine riesige Polypeptidkette (400 kDa), die sich in acht sauerstoffbindende, funktionelle Domänen faltet. Anders ist hingegen die Architektur der Arthropodenhämocyane: Hier wird das Gesamtmolekül aus heterogenen Polypeptidketten mit Molekulargewichten von 68 bis 75 kDa, die sich zu Hexameren formieren, aufgebaut. Die Hexamere kommen bei einigen Tiergruppen nativ vor, bei anderen sind sie zu (1x6)-, (2x6)-, (4x6)- und (8x6)-meren Gesamtmolekülen mit Molekulargewichten zwischen 500 und 3500 kDa aggregiert (MARKL, 1986).

Im **Hämocyanin** der Vogelspinne *Eurypelma californicum*, das in unserer Arbeitsgruppe erforscht wird, bilden 24 Untereinheiten ein mit 37 S sedimentierendes Molekülaggregat. Am Aufbau des 37 S-Hämocyanins sind 7 Polypeptidketten (a-g) mit Molekulargewichten von 68 kDa bis 74 kDa (SCHNEIDER et al., 1977) beteiligt, die immunologisch nicht kreuzreagieren (LAMY et al., 1979). Die einzelnen Untereinheiten liegen im 37 S-Molekül in konstanten stöchiometrischen Verhältnissen vor (MARKL et al., 1981):

$$a:b:c:d:e:f:g = 4:2:2:4:4:4:4$$

Durch Primärstrukturanalysen konnte bislang bei verschiedenen Arthropodenhämocyaninen eindeutig nachgewiesen werden,

daß die Heterogenität der Untereinheiten auf unterschiedlichen Aminosäuresequenzen der Polypeptidketten beruht (LINZEN et al., 1985; BAK et al., 1986; SOETER et al., 1986; SCHNEIDER et al., 1986; SCHARTAU et al., 1986) und damit genetischen Ursprungs ist.

Obgleich Mollusken- und Arthropodenhäemocyanine hinsichtlich ihrer physikalischen, chemischen und funktionellen Eigenschaften sehr eingehend untersucht sind (VAN HOLDE and MILLER, 1982; ELLERTON et al., 1983), beschäftigten sich bislang nur wenige Arbeitsgruppen mit dem Themenkomplex der Biosynthese, gewebsspezifischen Expression und Expressionsregulation der Häemocyanine.

FAHRENBACH (1970) konnte als Erster, beim Pfeilschwanzkrebs *Limulus polyphemus*, elektronenmikroskopisch Zellen nachweisen, in deren Cytoplasma Häemocyanin akkumuliert und zu typischen Häemocyaninkristallen aggregiert war. Diese als Cyanoblasten bezeichneten Zellen waren ribosomenreich, hatten nach voller Ausreifung eine Länge von etwa 100 µm und sammelten sich vor allem in den Hämolymphräumen hinter dem Komplexauge an. Der Bildungsort der Cyanoblasten blieb jedoch im Unklaren. GHIRETTI-MAGALDI et al. (1977) entdeckten mit Hilfe von Immunfluoreszenztechniken bei der Strandkrabbe *Carcinus maenas* Zellen mit Häemocyanin (Hämocyten) im retikulären Bindegewebe um die Aorta ophthalmica, in der Kropfwand sowie im Hepatopankreas. Als Ursprungsort für diese Zellen werden lymphatische Follikel in der Kropfwand der Krabbe angegeben. Mit Häemocyaninkristallen angefüllte Hämocyten wurden, mikroskopisch und immunologisch, auch in Retina und Subretinalspalt des Fangschreckenkrebses *Squilla mantis* nachgewiesen (SCHÖNENBERGER et al., 1980). SENKBEIL und WRISTON (1981) identifizierten über radioaktive in vitro-Markierung und Immunpräzipitation den Hepatopankreas von *Homarus americanus* als Häemocyaninbiosyntheseort.

Für blaublütige Vertreter aus dem Stamm der Mollusken werden bislang drei mögliche Syntheseorte für das Häemocyanin diskutiert: Bei Gastropoden die verstreut im Bindegewebe

liegenden Porenzellen (SMINIA, 1972; SKELDING and NEWELL, 1975; SMINIA, 1977), sowie die paarig angelegten Branchialdrüsen der Cephalopoden (DILLY and MESSENGER, 1972; SCHIPP et al., 1973; MESSENGER et al., 1974). Ob bei verschiedenen Gastropoden auch die Zellen der "Blutdrüse" nahe der vorderen Aorta an der Hämocyaninbiosynthese beteiligt sind (SCHMEKEL and WEISCHER, 1973) ist umstritten (SMINIA, 1977).

Aufbauend auf den aus Elektronenmikroskopie und Immunfluoreszenz gewonnenen Erkenntnissen über mögliche Synthesorte begannen in neuerer Zeit einige Arbeitsgruppen, Fragestellungen der Hämocyaninbiosynthese mit molekularbiologischen Methoden anzugehen. Die bisherigen Arbeiten dieser Richtung versuchen vor allem den Nachweis gewebsspezifischer Hämocyaninsynthese über immunpräzipitierbare in vitro-Translationsprodukte isolierter mRNAs zu erbringen. Hämocyanin-mRNA wurde sowohl in der Branchialdrüse von *Loligo vulgaris* (VANDERBEKE et al., 1981) und *Sepia officinalis* (VANDAMME et al., 1985; PRÉAUX et al., 1986; VANDAMME et al., 1987), als auch in den Kiemen dieser beiden Cephalopoden gefunden (VANDERBEKE et al., 1982). Ebenfalls in der Branchialdrüse von *Sepia officinalis* wiesen AVISSAR et al. (1986) Hämocyanin-mRNA durch Northern Blot-Analyse über die Hybridisierung mit einer synthetischen Oligonukleotidprobe nach. Bei Vertretern aus dem Stamme der Arthropoden konnte Hämocyanin-mRNA bei *Limulus polyphemus* in Gewebsregionen hinter dem Komplexauge charakterisiert werden (WOOD and BONAVENTURA, 1981; SIGGENS and WOOD, 1983), ferner im Hepatopankreas von *Astacus leptodactylus* (DE BETHUNE et al., 1985), sowie in der Kropfwand und im Hepatopankreas von *Cancer pagurus* (JACOBS et al., 1984; PRÉAUX et al., 1986) und der Endocuticula von *Androctonus australis* (ALLIEL et al., 1983). Zur Isolierung von Hämocyanin-mRNA aus dem Skorpion *Leiurus quinquestriatus* wurde das ganze Tier verarbeitet (AVISSAR et al., 1981, 1986).

Vor einigen Jahren gelang es, auch bei der Vogelspinne *Eurypelma californicum* durch immunfluorometrische Methoden,

Immunhistochemie sowie in vitro-Einbau von ^3H -Leucin in Gewebsextrakte eindeutig Hämocyanin-produzierende Zellen im Vogelspinnenherzen zu identifizieren (KEMPTER, 1983). Wie rasterelektronenmikroskopische Darstellungen zeigten, sind die kugeligen Hämocyten einer Größe von etwa 10 bis 15 μm dem Muskelfasernetzwerk der Herzinnenwand aufgelagert. Nach Hämolymphentnahme wurde eine auffällige Proliferation der Hämocyten beobachtet (KEMPTER, 1983).

In einer vorausgehenden Arbeit (VOIT, 1984) wurde mRNA aus Herzgewebe isoliert, in Kaninchenreticulocytenlysaten in vitro exprimiert, und Hämocyanin in den in vitro-Translationsprodukten durch Immunpräzipitation nachgewiesen. An diesen Versuchen anknüpfend lag nun die Hauptzielsetzung der vorliegenden Arbeit darin, die Primärstrukturanalyse von Hämocyaninuntereinheiten der Vogelspinne *Eurypelma californicum* über die cDNA-Charakterisierung zu etablieren. Die Gewinnung hämocyaninspezifischer cDNA sollte darüber hinaus auch die Grundlage für weitere, molekularbiologische Arbeiten bilden, wie der Suche nach den Strukturgenen des Hämocyanins im Genom der Spinne und deren Organisation. Molekular-genetische Arbeitstechniken waren dabei neu in die Arbeitsgruppe einzuführen. Im Rahmen meiner Arbeit sollten folgende Aufgabenbereiche bearbeitet werden:

1. Optimierung der Hc-Immunpräzipitation aus in vitro-Translationsprodukten.
2. Erstellung von cDNA-Genbanken aus Herzgewebe-mRNA.
3. Screening der cDNA-Genbanken mit einer synthetischen Oligonukleotidprobe, die von der hoch konservierten Aminosäuresequenz H-H-W-H-W-H (SCHNEIDER et al., 1982; LINZEN et al., 1985) im Kupfer A-Bindungszentrum abgeleitet war.
4. DNA-Sequenzierung positiver cDNA-Klone.

B. MATERIAL UND METHODEN

I. Materialien

1. Chemikalien

Die Laborchemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen MERCK/Darmstadt, SIGMA/Taufkirchen b. München und FLUKA/Buchs, Schweiz, bezogen und waren in p.A. Qualität:

Cäsiumchlorid	BRL/Eggenstein
Sephadex G-50 fine	PHARMACIA/Freiburg
Acrylamid (2 x kristallisiert)	SERVA/Heidelberg
Bromphenolblau	
Coomassie Brilliant Blue	
DEAE-52 Cellulose	
Harnstoff	
PEG 6000	
SDS	
Xylencyanol	

2. Materialien für die Molekularbiologie

IPTG	BIOMOL/Ilvesheim
X-Gal	
Ionenaustauscher AG501-X08	BIORAD/München
Alkalische Phosphatase	BOEHRINGER/Mannheim
AMV Reverse Transkriptase	
T4 DNA-Ligase	
DNA-Polymerase I (Kornberg-Polymerase)	
DNA-Polymerase I (Klenow Fragment)	
Eichproteine	
16S, 23S E. coli rRNA	

Agarose	BRL/Eggenstein
E. coli DNA-Ligase	
T4 DNA-Ligase	
Exonuklease III und VII	
Kaninchenreticulocyten-Lysat	
Lambda-DNA	
Restriktionsenzyme	
RNase H	
Agar	GIBCO/Eggenstein
Baktotrypton	
Hefeextrakt	
X-OMAT AR Filme	KODAK/Rochester, New
Intensifier Screens	York, USA
AMV Reverse Transkriptase	LIFE SCIENCES/St. Peters-
	burg, Florida, USA
Makromould DNA Sequenzierappara- tur und Zubehör	LKB/München
Nitrocellulose-Filter (HATF)	MILLIPORE/Eschborn
Glaskapillaren ($\emptyset$ 0.1 mm)	MÜLLER/Berlin
M13 Universal Sequencing Primer	NEW ENGLAND BIOLABS/Schwal-
M13 Reverse Sequencing Primer	bach b. Frankfurt
Deoxynukleotide	PHARMACIA/Freiburg
Dideoxynukleotide	
DNA-Polymerase I (Klenow Fragment, kloniert)	
T4 DNA-Polynukleotidkinase	
Oligo(dT) ₁₂₋₁₈	
Protein A-Sepharose	
Terminale Deoxynukleotidtransferase	
DEAE Membranen (NA45)	SCHLEICHER & SCHÜLL/Dassel
Nitrocellulose Filter (BA85)	
Sterile Membranfilter ($\emptyset$ 0.45 μ m)	

Silikonlösung	SERVA/Heidelberg
Ampicillin	SIGMA/Taufkirchen b.
Chloramphenicol	München
Deoxyribonuklease I	
Human Placental RNase Inhibitor	
γ -(Methacryloxy)-propyltrimethoxysilan	
Proteinase K	
Ribonuklease	
Rinderserumalbumin	
Lachsspermien-DNA	
Tetracyclin	
WHATMAN 3MM Papier	VETTER/Wiesloch
WHATMAN GF/C Glasfaserfilter	

3. Radioaktive Substanzen

α - ³² P-dCTP (3000 Ci/mM)	AMERSHAM/Braunschweig
α - ³² P-dATP (3000 Ci/mM)	
γ - ³² P-ATP (3000 Ci/mM)	
α - ³⁵ S-dATP (400 Ci/mM)	
³ H-dCTP (1 Ci/mM)	
L- ³⁵ S-Methionin (1200 Ci/mM)	

4. Bakterienstämme, Phagen und Plasmide

DH1	F ⁻ , endA1, hsdR17(rk ⁻ ,mk ⁺), supE44, thi-1, λ ⁻ , recA1, gyrA96, relA1 (HANAHAN, 1983).
DH5 α	Genotyp wie DH1, zusätzlich: ϕ 80dlacZ Δ M (BRL, 1986).
JM103	supE, thi ⁻ , Δ (lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacI ^q Z Δ M15] (MESSING, 1983).
JM109	recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17, supE44, relA1, λ ⁻ , Δ (lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacI ^q Z Δ M15] (YANISCH-PERRON et al., 1985).

pBR322	(BOLIVAR et al., 1977) Bezugsquelle: BRL
pUC8, pUC9	(VIEIRA and MESSING, 1982) Geschenk der AG Dr. Moritz/Zoolog. Inst. und Prof. Winnacker/Biochem. Inst., München
pUC18, pUC19	(YANISCH-PERRON et al., 1985) Geschenk der AG Dr. Domdey, Genzentrum, München.
M13mp8/9/10/11	(MESSING and VIEIRA, 1982; MESSING, 1983) Bezugsquelle: AMERSHAM/Braunschweig
pUC9 _(dG)	Bezugsquelle: PHARMACIA/Freiburg
pBR322 _(dG)	Bezugsquelle: BRL

5. Medien für die Bakterien- und Phagenkulturen

Stammlösungen für Selektionsmarker

Ampicillin (Na-Salz)	: 25 mg/ml in H ₂ O
Tetracyclin-Hydrochlorid	: 12.5 mg/ml in 50 % (v/v) Ethanol
Chloramphenicol	: 34 mg/ml in Ethanol
X-Gal	: 2 % (w/v) in Dimethylformamid
IPTG	: 0.1 M in H ₂ O

Die Sterilisation erfolgte jeweils durch Filtration.

DH1-Medium

Baktotrypton	20 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
H ₂ O	ad 1 l.

Mit 1 M KOH pH-Wert auf 7.6 einstellen.

DH1-Platten

DH1-Medium mit 15 g Agar/l.

DH1 F-Platten

DH1 Freezing-Platten enthalten zusätzlich 5 % Glycerin.

DH1 amp Platten

DH1 Platten mit 50 µg Ampicillin/ml.

DH1 tet Platten

DH1 Platten mit 12.5 µg Tetracyclin/ml.

DH1 cam Platten

DH1 tet Platten mit zusätzlich 170 µg Chloramphenicol/ml.

DH1 amp/X-Gal Platten

DH1 Platten, die zusätzlich 0.004 % X-Gal, sowie 0.1 mM IPTG enthalten.

Glucose Minimalmedium

M9 Salze: Na_2HPO_4	6 g
KH_2PO_4	3 g
NH_4Cl	1 g
NaCl	0.5 g
H_2O	ad 500 ml
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ (1 M)	1 ml
CaCl_2 (0.1 M)	10 ml
Thiamin-HCl (1 M)	1 ml
Glucose (20 %)	10 ml

Die jeweiligen Salzlösungen wurden getrennt autoklaviert, Vitamin B₁ und Glucose steril filtriert und sodann vereint.

H_2O ad 1 l.

Glucose Minimalmedium-Platten

Glucose Minimalmedium mit 15 g Agar/l.

2 x TY-Medium

Baktotrypton	16 g
Hefeextrakt	10 g
NaCl	5 g
H ₂ O	ad 1 l.

H-Platten

Baktotrypton	10 g
NaCl	8 g
Agar	15 g
H ₂ O	ad 1 l.

H-Top Agar

Baktotrypton	10 g
NaCl	8 g
Agar	6 g
H ₂ O	ad 1 l.

6. Häufig verwendete Puffer und Lösungen

TE-Puffer	: 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 1 mM EDTA, pH 8.0
0.2 M EDTA, pH 8.0	: EDTA (Na ₂) Salz mit NaOH ad pH 8.0
20 x SSC	: 0.3 M Natriumcitrat, 3 M NaCl
50 x Denhardt's Lösung	: 5 g Ficoll 5 g Polyvinylpyrrolidon 5 g BSA ad 500 ml mit H ₂ O
Lysozym-Stammlösung	: 25 mg Lysozym/ml in H ₂ O
RNAse-Stammlösung	: 10 mg/ml RNAse A in 10 ml Tris-HCl, pH 7.5, 15 mM NaCl; zur Entfernung von DNase de- und renaturiert nach MANIATIS et al. (1982).
Lachs-DNA-Stammlösung	: 10 mg/ml in H ₂ O; durch Ultraschall- behandlung zerkleinert und anschlie- ßend hitzedenaturiert (MANIATIS et al., 1982).

II. Methoden

1. Tiere, Tierhaltung und Herzpräparation

Das Versuchstier *Eurypelma californicum* ist im Süden und Südwesten der USA beheimatet und lebt dort weit verbreitet. Bei den für die Klonierungsversuche verwendeten Vogelspinnen handelte es sich ausschließlich um Freilandtiere. Sie wurden über die Firma CAROLINA BIOLOGICAL Co. (Burlington/N.C.) bezogen. Über die Haltung dieser Vogelspinnenart war bereits früher berichtet worden (LOEWE and LINZEN, 1973).

Hämocyaninproduzierende Zellen wurden bei der Vogelspinne *E. californicum* im Herzen nachgewiesen (KEMPTER, 1983). Die biosynthetisch aktiven Zellen, deren Proliferation durch Hämolymphentnahme stark stimuliert werden kann, sind den in das Herzlumen reichenden Herzmuskelsepten aufgelagert.

Zur Gewinnung biosynthetisch stark aktiver Hämocyten wurden dem Versuchstier 4-5 Tage vor der Präparation durch dorsale Punktion des Herzens etwa 400 µl Hämolymphe entnommen. Für die Präparation wurde die Spinne durch Abkühlung (2 Stunden bei 4 °C, 30 min bei -20 °C) betäubt, gewogen und am Pedicellus mit einem chirurgischen Faden abgebunden. Dadurch konnte bis zur Herzentnahme keine hämocytenhaltige Hämolymphe aus dem Herzlumen ausströmen. Der Pedicellus wurde nahe am Prosoma durchgeschnitten und die weitere Präparation nach einer Anleitung von SHERMAN und PAX (1970) durchgeführt. Durch reichliches Spülen des freipräparierten Herzens mit Spinnenringer wurde das ventral und lateral vom Herzen gelegene, ribonukleasereiche viscerele Gewebe entfernt. Die Zusammensetzung des Spinnenringers ist bei SCHAR-TAU und LEIDESCHER (1983) beschrieben. Da sich in den ersten Versuchen herausstellte, daß die Ausbeute an RNA aus isolierten Hämocyten allein sehr gering war, wurde für alle folgenden Aufarbeitungen das gesamte Herz entnommen und homogenisiert (s. II.3.).

2. Ständig verwendete Routinemethoden

2.1. Sterilisation

Alle Glaswaren, Plastikgefäße und Lösungen wurden durch 20-30-minütiges Autoklavieren bei 121 °C sterilisiert. Nicht autoklavierbare Lösungen wurden durch Sterilmembranfilter der Porengröße 0.45 µm filtriert.

2.2. Proteinbestimmung

Der Proteingehalt der zellfreien Hämolymphe und des dissoziierten 37 S-Hämocyanins wurde durch Extinktionsmessung bei 280 nm bestimmt; dabei entspricht ein E_{280} Wert von 1 ungefähr 1 mg Protein pro ml (LOEWE and LINZEN, 1973).

2.3. DNA Bestimmung

Der DNA-Gehalt einer Lösung wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm gemessen. Ein Extinktionswert von 1 wurde, falls dsDNA in der Lösung vorlag, gleich 50 µg/ml DNA gesetzt. Für ssDNA wurde bei dem selben Wert eine Konzentration von 40 µg/ml angenommen (MANIATIS et al., 1982).

2.4. RNA-Bestimmung und UV-Spektren

Ein Extinktionswert von 1, gemessen bei der Wellenlänge von 260 nm, entspricht 40 µg/ml RNA. Zur Überprüfung der Reinheit isolierter RNA wurden mit einem Spektralphotometer (Modell 118 der Firma CARY) Absorptionsspektren im Wellenlängenbereich zwischen 220 und 330 nm automatisch aufgezeichnet. Aus diesen Spektren wurde der Quotient der Absorptionswerte bei 260 nm/280 nm errechnet, der bei reiner RNA bei 2.0 bis 2.3 liegen sollte.

2.5. Extraktion mit Phenol und Chloroform

Lösungen: Kristallines Phenol wurde geschmolzen, unter 1 M Tris-HCl, pH 8.0 aufbewahrt und bei Bedarf mit TE-Puffer äquilibriert. Chloroform war stets mit 4 % Isoamylalkohol versetzt.

Extraktionen: Wenn nicht anders vermerkt, wurden DNA-Lösungen mit gleichen Volumina Phenol extrahiert, die Phasen durch Zentrifugation getrennt, die wässrige Phase zunächst mit einem Volumen Phenol:Chloroform/1:1, sodann mit einem Volumen Chloroform reextrahiert. RNA-Isolate wurden ausschließlich mit einem Volumen Chloroform in einem Schritt extrahiert.

2.6. Alkoholfällung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren in wässrigen Lösungen wurden durch Zugabe von 0.1 Volumen 3 M Natriumacetat, pH 4.8 und 2 bis 2.5 Volumina Ethanol gefällt. Handelte es sich um eine stark verdünnte DNA/RNA-Lösung, so wurde tRNA als Carrier bis zu einer Konzentration von 50 µg/ml zugegeben (MARCUS et al., 1978). Zur Präzipitation wurde über Nacht bei -20 °C oder 30 min bei -70 °C inkubiert und die Präzipitate bei 12000xg und 4 °C 20 min lang abzentrifugiert. Der Nukleinsäure Niederschlag wurde einmal mit 70 %igem Ethanol gewaschen und anschließend in einer Vakuumzentrifuge ("SPEED-VAC") getrocknet.

3. Isolierung von RNA

Die Isolierung von RNA erfolgte durch Extraktion in hochmolarer Guanidiniumthiocyanatlösung, einem starken Inhibitor von Ribonukleasen, und nachfolgender Zentrifugation durch ein Cäsiumchloridkissen (CHIRGWIN et al., 1979). Das Herzgewebe (ca. 100 mg) wurde nach Präparation und Wiegen sofort in 1 ml 4 M Guanidiniumisothiocyanatlösung gegeben und bei

Raumtemperatur mit einem Teflon-Homogenisator homogenisiert. Der Homogenisierungspuffer setzte sich wie folgt zusammen: 4 M Guanidiniumisothiocyanat, 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 10 mM EDTA, 0.5 % N-Laurylsarkosinat, 25 mM Natriumcitrat, pH 7.0, 0.1 M β -Mercaptoethanol, sowie 0.1 % Antifoam (30 %). Das Zellhomogenat wurde mit festem Cäsiumchlorid bis zu einer Konzentration von 1 g CsCl pro 2.5 ml Homogenat versetzt und ultrazentrifugiert. Dazu wurden 1.2 ml einer autoklavierten 5.7 M CsCl-Lösung in 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5 mM EDTA, in ein Zentrifugenröhrchen gefüllt, das Homogenat über das Cäsiumchloridkissen geschichtet und 22 Stunden bei 36000 rpm, 20 °C, in einem BECKMAN SW 50.1 Swing out-Rotor zentrifugiert. Der Überstand der Zentrifugation wurde verworfen, der Boden des Zentrifugenröhrchens abgeschnitten und das RNA-Pellet in 200 μ l SDS-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5 mM EDTA, 1 % SDS) gelöst (MANIATIS et al., 1982). Zur Verbesserung der Löslichkeit der RNA im Puffer wurde 2 min auf 65 °C erwärmt. Die Lösung wurde anschließend einmal mit Chloroform extrahiert und die organische Phase einmal mit 100 μ l SDS-Puffer reextrahiert. Die RNA in den vereinigten wässrigen Phasen wurde mit Ethanol über Nacht bei -20 °C präzipitiert. RNA, die nicht sofort weiterverarbeitet wurde, wurde als Pellet in 70 % Ethanol bei -70 °C aufbewahrt.

4. In vitro Translation von RNA und Immunpräzipitation

4.1. In vitro Translationsansatz

Für alle in vitro Translationsversuche wurde ein Kaninchenreticulocytenlysate (System IV T) der Firma BRL verwendet. Das Lysat war nach den Vorschriften von PELHAM und JACKSON (1976) hergestellt und zur Eliminierung der endogenen mRNA-Translationsaktivität mit Microkokkennuklease behandelt. Optimale Translationseffizienzen für RNA-Isolate aus dem Vogelspinnenherzen wurden bei folgender Zusammensetzung des Assays erreicht:

	<u>Endkonzentration</u>
1.0 µl Magnesiumacetat (20 mM)	700 µM
3.0 µl Kaliumacetat (2 M)	200 mM
2.4 µl ³⁵ S-Methionin (1200 Ci/mM)	30 µCi
1.0 µl Hefe-tRNA (15 µg/µl)	15 µg
6 µg Gesamt-RNA aus Eurypelma Herzgewebe	6 µg
3.0 µl Translationsmix (10 x konzentriert) mit:	
HEPES (250 mM)	25 mM
Kreatinphosphat (100 mM)	10 mM
KCl (100 mM)	40 mM
alle Aminosäuren außer Methionin (je 500 µM)	50 µM
10 µl Kaninchenreticulocytenlysate (3 x konzentriert) mit:	
Häm (25 µM), Kreatinkinase (50 µg/ml), DTT (0.5 mM),	
EGTA (2 mM), Magnesiumchlorid (3.5 mM), Calciumchlorid	
(1 mM), Kaliumchlorid (25 mM), Natriumchlorid (70 mM),	
EDTA (50 µM)	
ad 30 µl H ₂ O bidest.	

Zur Kontrolle wurden in vitro-Translationen mit Globin-mRNA (125-500 ng), sowie Assays ohne Zugabe von mRNA (Ermittlung der endogenen Restaktivität) durchgeführt. Nach einer Translationsdauer von 75-90 min bei 29 °C wurde die Reaktion auf Eis gestoppt. Vor Reaktionsbeginn und zum Ende der Reaktion wurden 1 µl Proben entnommen, auf 1 cm² großes WHATMAN 3MM Papier getupft und die enthaltenen Polypeptidketten mit TCA gefällt. Dazu wurden die Filter 10 min lang in 10 % (w/v) TCA gekocht, auf Eis abgekühlt, sukzessive zweimal mit 5 % (w/v) TCA, Ethanol/Ether (1:1 v/v) und Ether gewaschen, getrocknet und die eingebaute Radioaktivität durch Szintillationsmessung (Quickszint 201) ermittelt (MANS and NOVELLI, 1961).

4.2. Immunpräzipitation

Für den immunologischen Nachweis von in vitro synthetisiertem Hämocyanin wurde Antiserum gegen dissoziiertes 37 S-Hämocyanin von Eurypelma californicum verwendet. Das Antiserum wurde durch Immunisierung von Kaninchen mit dissoziiertem 37 S-Hämocyanin gewonnen (LAMY et al., 1979) und von Frau Dr. Savel (Abt. Linzen) zur Verfügung gestellt. Jeweils

14 μ l des in vitro-Translationsansatzes wurden mit 40 μ l Antiserum zunächst 30 min bei 37 °C, dann über Nacht bei 4 °C inkubiert. Der lösliche Antigen-Antikörperkomplex wurde durch Zugabe von 80 μ l Protein A-Sepharose in 0.1 M Natriumphosphatpuffer, pH 8.0, 30 min lang bei 20 °C immobilisiert (KESSLER, 1981; MACSWEEN and EASTWOOD, 1981). Zur Reinigung der Protein A-Sepharose/Antigen-Antikörperkomplexe wurde zweimal mit 300 μ l 0.1 M Natriumphosphatpuffer, pH 8.0, 2 % Triton x-100, zweimal mit 300 μ l 0.1 M Natriumphosphatpuffer pH 8.0, ohne Triton gewaschen. Anschließend erfolgte die Dissoziation des Komplexes nach Zugabe von 40 μ l 1 M Essigsäure eine Stunde bei 20 °C. Nach Zentrifugation (5 min, 12000 x g, RT) konnte der Antigene und Antikörper enthaltende Überstand qualitativ in SDS-Polyacrylamidgelen analysiert werden. Der Anteil der radioaktiv markierten, immunopräzipitierten Translationsprodukte wurde ebenfalls nach Fällung mit TCA durch Flüssigkeitsszintillationsmessung überprüft.

4.3. Analytische SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Die Elektrophoresen wurden unter Verwendung von Apparaturen der Fa. HÖLZEL, Dorfen/Obb. im Plattengelfverfahren nach LAEMMLI (1970) durchgeführt, wobei ein 7.5-proz. Acrylamidgel, pH 8.8, als Trenngel und ein 3-proz. Acrylamidgel, pH 6.8, als Sammelgel diente. Die Proben wurden vor dem Auftragen 20 min bei 56 °C in 2 % SDS, 1 M β -Mercaptoethanol denaturiert und mit Bromphenolblau und Saccharose versetzt. Die Elektrophoresen liefen bei konstanter Spannung von 80 V über Nacht bei 4 °C. Die Gele wurden anschließend 2 Stunden in 0.15 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250 in 25 % TCA gefärbt und in einem H_2O :Methanol:Eisessig (170:10:15) Gemisch über Nacht entfärbt.

Für die Fluorographie der Polyacrylamidgele wurde das Verfahren nach BONNER und LASKEY (1974) angewandt. Die Gele wurden zweimal für 30 min in DMSO entwässert, 3 Stunden lang

in 20 % (w/w) PPO in DMSO imprägniert und anschließend mindestens eine Stunde - besser über Nacht - in H₂O gewässert. Die Lage der nichtradioaktiven Eichproteine wurde nach dem Trocknen der Gele auf Haushaltsfolie mit radioaktiver Tinte markiert. Die Gele wurden zwischen 6 Stunden und 5 Tagen mit KODAK X-OMAT AR Filmen bei -70 °C exponiert.

5. RNA-Agarosegel-Elektrophorese und Northernblotting

RNA-Moleküle besitzen in wässrigen Lösungen eine ausgeprägte Tendenz zu Sekundärstrukturbildungen und intermolekularen Aggregationen. Daher sind Längenbestimmungen von RNA Molekülen nur in Gegenwart stark denaturierender Agentien wie Formamid, Formaldehyd, Quecksilbermethylhydroxid oder Glyoxal möglich. In der vorliegenden Arbeit wurde die RNA durch Glyoxylierung denaturiert: DMSO zerstört bei hohen Temperaturen die für die RNA-Sekundärstrukturen verantwortlichen Wasserstoffbrücken, Glyoxal kann sich nun an die Guaninbasen der RNA kovalent anlagern und so das Molekül im denaturierten Zustand fixieren (McMASTER and CARMICHAEL, 1977).

Das Denaturierungsmix hatte folgende Zusammensetzung:

50.0 µl DMSO

14.5 µl Glyoxal (40 % in H₂O, deionisiert mit BIORAD
AG501-X8 Ionenaustauscher)

2.0 µl 10 % SDS

2.0 µl 0.5 M Natriumphosphatpuffer, pH 6.5

3 µl wässrige RNA-Lösung mit ca. 8 µg Eurypelma Gesamt-RNA aus Herzgewebe wurden mit 6.5 µl Denaturierungsmix 30 min bei 50 °C inkubiert, mit 1 µl 1 % Bromphenolblau und Saccharose versetzt und sofort auf ein horizontales 1.0 % (w/v) Agarosegel in 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6.5, aufgetragen. Als Elektrodenpuffer diente ebenfalls 10 mM Natriumphosphat, pH 6.5, wobei die Puffer in den beiden Reservoirs wegen ihrer geringen Pufferkapazität alle 15 min gegeneinander ausgetauscht wurden. Glyoxal dissoziiert bei pH-Werten

über 8 von DNA/RNA wieder ab. Die Elektrophorese wurde bei konstanter Stromstärke von 50 mA gefahren. Als Marker für die Längenbestimmung dienten 16S und 23S rRNA von E. coli, sowie mit Hind III verdaute DNA des Phagen λ . DNA- und RNA-Marker wurden wie die Proben-DNA mit DMSO und Glyoxal behandelt.

Nach beendetem Lauf wurden DNA- und RNA-Marker vom restlichen Gel abgetrennt, 30 min lang in 50 mM NaOH deglyoxyliert, kurz zwischengewässert, in 100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, pH 7.0, neutralisiert, mit Ethidiumbromid (1 μ g/ml) gefärbt und unter UV-Licht photographiert.

Das restliche Gel wurde ohne zusätzliche Behandlung zum Transfer der RNA auf Nitrocellulose verwendet. Dabei wurde nach der gleichen Prozedur vorgegangen, die für den Transfer von DNA auf Nitrocellulosefilter (Southern Blot) beschrieben ist (B. 9.5), bis auf folgende Abwandlungen: Die Transferdauer betrug 24 Stunden, nach 2-stündigem Backen des Blots bei 80 °C mußte das gebundene Glyoxal durch 10-minütiges Waschen des Filters in 100 °C heißem 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, entfernt werden (THOMAS, 1980).

6. cDNA-Synthese

Die Synthese und anschließende Klonierung der cDNA erfolgte im wesentlichen nach der bei GUBLER und HOFFMAN (1983) beschriebenen Methode. Für die Synthese wurde jeweils die Gesamtmenge an RNA aus einem Vogelspinnenherzen eingesetzt. Auf eine Anreicherung von poly(A)⁺-RNA über Oligo(dT)-Säulen war verzichtet worden.

6.1. Synthese des ersten cDNA-Stranges

Die cDNA-Erststrangsynthese wurde mit Oligo(dT)-Primern initiiert und bei 42 °C unter folgenden Reaktionsbedingungen in einem Endvolumen von 50 μ l durchgeführt:

50 mM Tris-HCl, pH 8.3
6 mM MgCl₂
10 mM DTT
100 mM NaCl
je 1.25 mM dCTP, dGTP, dTTP
0.5 mM dATP
20 µCi α ³²P-dATP (3000 Ci/mM)
30 U RNase-Inhibitor RNasin
50 U Reverse Transkriptase
5 µg Oligo(dT)₁₂₋₁₈
ca. 40 µg Eurypelma Gesamt-RNA aus Herzgewebe

Zur Auffaltung des mRNA-Stranges wurde die RNA vor Zugabe der Reagenzien 5 min auf 65 °C erhitzt. In Versuchen ohne Verwendung des radioaktiven Tracers betrug die Konzentration an dATP ebenfalls 1.25 mM. Nach einer Inkubationsdauer von 90 min wurde die Synthese durch Zugabe von 2.5 µl EDTA (0.2 M), pH 8.0, gestoppt.

An Hand der TCA-präzipitierbaren Radioaktivität (MANIATIS et al., 1982) ist eine grobe Abschätzung der Menge synthetisierter cDNA möglich: 1 µl des Ansatzes wurde hierfür mit 10 µg Kalbsthymus-DNA als Carrier versetzt und 10 min auf Eis in 5 ml 5 % TCA, 1 % Natriumpyrophosphat gefällt. Die Präzipitate wurden anschließend auf WHATMAN GF/C Filtern gesammelt, die Filter mit 5 % TCA und 70 % Ethanol gewaschen, bei 80 °C getrocknet und die Radioaktivität der Präzipitate im Szintillationsgerät bestimmt.

Das restliche Probenvolumen wurde mit H₂O auf 150 µl erhöht. Es folgten eine Extraktion mit 1 Volumenteil Phenol/Chloroform und zwei Reextraktionen der organischen Phasen mit 60 µl bzw. 40 µl H₂O. Die wässrigen Phasen wurden vereinigt und aus ihnen die nicht in DNA inkorporierten Nukleotide durch zweimalige Ammoniumacetatfällung entfernt. Dies erfolgte durch Zugabe von 1 Volumenteil 4 M Ammoniumacetatlösung und 2.5 Volumenteilen Ethanol. Das die mRNA-cDNA-Hybride enthaltende Pellet der zweiten Präzipitation wurde für die Zweitstrangsynthese in 23 µl H₂O gelöst.

6.2. Alkalische Agarosegel-Elektrophorese

Die Länge der Transkripte wurde mittels einer alkalischen Agarosegel-Elektrophorese (McDONNELL et al., 1977) abgeschätzt. Die Agarose (2 % w/v) wurde in 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8.0, gelöst, das Gel gegossen und nach Erstarren mindestens 30 min lang mit alkalischen Elektrophoresepuffer (30 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH 8.0) überschichtet. Für die elektrophoretische Analyse wurden ca. 20000 cpm der cDNA-Erststrangsynthese mit Probenauftragspuffer versetzt. Die Elektrophoresen liefen über Nacht in langen Flachgelen bei 40 V und 40-50 mA. Nach dem Lauf wurden die Gele 30 min in 10 % Eisessig neutralisiert, getrocknet und autoradiographiert.

Probenauftragspuffer: 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 50 µg/ml Bromphenolblau, 42.5 % (w/v) Saccharose.

6.3. Synthese des zweiten cDNA-Stranges

Die Aktivität zweier Enzyme, der Ribonuklease H und der Kornberg Polymerase I, führen, nach der Methode von GUBLER und HOFFMAN (1983), zu doppelsträngiger cDNA. Während die RNase H spezifisch im RNA-DNA-Duplex-Bereich RNA partiell verdaut, benützt die DNA Polymerase I die von der Ribonuklease geschaffenen Oligoribonukleotide als Primer für die Zweitstrangsynthese. Die entstehenden DNA-Fragmente werden durch DNA-Ligase kovalent zum durchgehenden, komplementären DNA-Strang verbunden. Der große Vorteil dieser Methode besteht darin, daß sich die Verdauung der "Haarnadelschleifen" zwischen erstem und zweitem cDNA-Strang erübrigt, wie sie bei alkalischer Hydrolyse des RNA-Templates erforderlich wäre (z. B. MANIATIS et al., 1982).

Experimentell wurden für die Zweitstrangsynthese folgende Reaktionsbedingungen herangezogen:

23 μ l Erststrang-cDNA in H₂O
8 μ l dATP, dCTP, dGTP, dTTP (je 10 mM)
50 μ l Zweitstrangpuffer (2 x konzentriert) mit:
40 mM Tris-HCl, pH 7.5
10 mM MgCl₂
200 mM KCl
100 μ g/ml BSA
20 mM (NH₄)₂SO₄
1 μ l β -NAD (15 mM)
1 U E. coli DNA-Ligase
30 U DNA Polymerase I
1 U RNase H
ad 100 μ l H₂O.

Die Reaktion wurde zunächst 1 Stunde bei 15 °C, dann eine weitere Stunde bei 22 °C inkubiert und durch Zugabe von 5 μ l EDTA (0.2 M), pH 8.0, abgestoppt. Wie bereits für die Erststrangsynthese beschrieben, folgten eine Extraktion mit Phenol/Chloroform sowie zwei Ammoniumacetat/Ethanol-Fällungen.

6.4. Homopolymeres Tailing der cDNA

An die doppelsträngige cDNA wurde in Anwesenheit von 0.6 mM dCTP, 0.2 % BSA, 120 mM Natriumcacodylat, pH 7.2, 1 mM CoCl₂ sowie 0.1 mM DTT homopolymer dC addiert. Das Reaktionsvolumen betrug 30 μ l, die Reaktion wurde durch Zugabe von 30 U Terminaler Transferase bei 37 °C gestartet und nach 30 min in 20 mM EDTA, pH 8.0, beendet. Nach einer Extraktion mit Phenol/Chloroform und anschließender Ethanolfällung konnte die cDNA in Plasmide kloniert werden.

Verwendet man zur Tailing-Reaktion Tritium-markierte Nukleotide, so ist es möglich, die zeitabhängige Addition der dC-Reste zu verfolgen. In diesem Falle wurde im Reaktionsansatz unmarkiertes dCTP gegen 10 μ Ci ³H-dCTP (1 Ci/mM) ausgetauscht. Die Reaktion wurde gestartet und in 10-minütigen Zeitintervallen Proben von 1 μ l entnommen, mit TCA gefällt (siehe B. 6.1.) und der Einbau an Radioaktivität mit Flüssigszintillationsmessung überprüft.

7. Klonierung von cDNA in Plasmide

In verschiedenen Experimenten wurde dC-getailte cDNA in die Vektoren pBR322, pUC9 und pUC19 kloniert. Hierzu war die Vektor-DNA jeweils mit Pst I linearisiert und mit dG, komplementär zur cDNA, an den 3'-Enden verlängert worden. Insertion von cDNA in Vektor-DNA erfolgte über dC/dG-Basenpaarung. Pst I-geschnittene, dG-getailte pUC9- und pBR322-Vektoren wurden kommerziell bezogen, pUC19-DNA wurde selbst präpariert.

7.1. Homopolymeres Tailing von pUC-Vektor-DNA

5 µg einer im Cäsiumchloridgradienten gereinigten pUC19-Plasmid-DNA waren, wie im Kapitel B.9. beschrieben, vollständig mit dem Enzym Pst I linearisiert und die 5'-Enden dephosphoryliert worden. Die Addition der dG-Reste an die 3'-Enden der Plasmid-DNA verlief prinzipiell unter den gleichen Reaktionsbedingungen, wie sie für das Tailing der cDNA angeführt wurden, außer daß der Ansatz 0.6 mM dGTP anstelle von dCTP enthielt, 80 U Terminale Transferase eingesetzt wurden und das Reaktionsvolumen 50 µl betrug. Nach Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung wurde die getailte Vektor-DNA in einer Konzentration von ca. 250 ng DNA/µl H₂O gelöst und bei -20 °C aufbewahrt.

7.2. Annealing von cDNA und Vektor-DNA

Zum Annealing wurden getailte Vektor-DNA in etwa 10-fachem Gewichtsüberschuß gegenüber getailter cDNA (GUBLER and HOFFMAN, 1983) in Annealing-Puffer in einem Volumen von 50-150 µl vereint und für 5 min auf 65 °C erhitzt. Das Gemisch wurde dann 10 min bei 58 °C, 90 min bei 42 °C inkubiert und anschließend innerhalb der folgenden 2 Stunden auf RT abge-

kühlt. Ein Aliquot der chimären Plasmide wurde sofort zur Transformation eingesetzt, der restliche Ansatz bei -20 °C gelagert. Der Annealing-Puffer hatte folgende Zusammensetzung (MANIATIS et al., 1982):

100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.8, 1 mM EDTA.

7.3. Transformationsprotokoll für E. coli DH1 und DH5 α -Zellen

Kompetenzinduktion bei E. coli DH1/DH5 α -Zellen

Mit einer Bakterienkolonie des entsprechenden Stammes wurden 10 ml DH1 Medium angeimpft und die Bakterienkultur bis zu einer O.D.₅₅₀ von 0.3 bei 37 °C geschüttelt. Diese Vorkultur wurde 1:20 mit DH1 Medium verdünnt und etwa 3 Stunden bei 37 °C weiter geschüttelt, bis die photometrische Bestimmung bei 550 nm den Wert 4.8 erreicht hatte. In dieser logarithmischen Wachstumsphase wurde die Kultur in einem SORVALL GSA-Rotor abzentrifugiert (4 °C, 6000 rpm, 5 min) und das Zellpellet in eiskaltem Transformationspuffer I in 2/5 des ursprünglichen Volumens aufgenommen. Die Zellsuspension wurde für 5 min auf Eis gestellt, die Zellen erneut pelletiert und nun in 1/25 des ursprünglichen Ausgangsvolumens in eiskaltem Transformationspuffer II resuspendiert. Nach einer weiteren 15-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen in 0.1 ml Portionen in sehr gut vorgekühlte Gefriergefäße gefüllt und sofort bei -70 °C tiefgefroren.

Die Transformationspuffer hatten folgende Zusammensetzung (HANAHAH, 1985):

Transformationspuffer (TFB) I:

30 mM Kaliumacetat
100 mM Rubidiumchlorid
10 mM Calciumchlorid
50 mM Manganchlorid
15 % Glycerin

Mit 0.2 M Essigsäure ad pH 5.8; steril filtrieren.

Transformationspuffer (TFB) II:

10 mM PIPES
75 mM Calciumchlorid
10 mM Rubidiumchlorid
15 % Glycerin

Mit HCl ad pH 6.5; steril filtrieren.

Transformation mit cDNA-Plasmiden

Zur Transformation wurden jeweils 100 µl kompetenter DH1- bzw. DH5α -Zellen bei RT aufgetaut, 10 min auf Eis vorinkubiert und mit 1/5 des Annealing-Ansatzes (10 µl) versetzt. Nach weiteren 45 min auf Eis wurde der Ansatz 90 sec auf 42 °C erhitzt, 2 min zurück auf Eis gestellt, mit 4 Volumenteilen DH1-Medium verdünnt und 30 min leicht bei 37 °C geschüttelt. Im Falle von cDNA-Transformationen wurde zunächst ein 10 µl Aliquot des Ansatzes auf einer DH1-Agarplatte mit dem für das verwendete Plasmid notwendigen Selektionsmarker ausplattiert, über Nacht bei 37 °C inkubiert und die Transformationseffizienz festgestellt. Aus dieser konnte sodann die Volumenmenge berechnet werden, die die gewünschte Anzahl von Transformanten pro Agarplatte ergeben sollte (HANAHAH, 1983).

Für Transformationen in pBR322-Plasmiden wurde auf DH1-tet-Platten, für Klonierungen in pUC-Plasmiden auf DH1 amp-Platten bzw. DH1 amp/X-Gal-Platten selektioniert. Zum Ausplattieren der restlichen Transformationskultur wurden autoklavierte Nitrocellulosefilter auf Glycerin und Antibiotikum enthaltende Agarplatten, sog. "Freezing-Plates" (F-Platten) gelegt, und die Bakterien bis zu einer Dichte von 2000 Kolonien pro Platte auf dem Filter (=Masterfilter) ausplattiert. Die Platten wurden bei 37 °C inkubiert, bis die Bakterienkolonien eine Größe von 0.5-1 mm erreicht hatten.

Zur Aufbewahrung von Plasmid-Genbanken wurde wie bei HANAHAH und MESELSON (1980) beschrieben vorgegangen: Auf den Masterfilter wurde ein zweiter, steriler Nitrocellulosefilter (=Replikafilter) gelegt, beide Filter wurden zwischen

Glasplatten gleichmäßig zusammengepreßt, einheitlich markiert und als Sandwich zwischen je drei Lagen trockenen und einer Lage feuchten WHATMAN 3MM Papiers in Gefrierbeutel eingeschweißt und bei -70 °C aufbewahrt.

8. Isolierung von Plasmid-DNA

8.1. Minilyse

Zur Isolierung kleinerer Mengen wurde vor allem die alkalische Extraktionsmethode angewandt (BIRNBOIM and DOLY, 1979; modifiziert HEINRICH, 1986). 5 ml Medium mit Resistenzmarker wurden mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Die Zellen der Übernachtskultur wurden abzentrifugiert (6000 x g, 10 min, 4 °C), einmal mit 2.5 ml eiskaltem TNE-Puffer gewaschen, erneut zentrifugiert, in 100 µl Lysozypuffer aufgenommen und 5 min bei RT lysiert.

TNE-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA

Lysozypuffer: 5 mg/ml Lysozym, 50 mM Glucose, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0.

Anschließend wurde durch Zugabe von 200 µl 0.2 N NaOH/1 % SDS denaturiert und mit 150 µl 3 M Natriumacetat, pH 4.8 neutralisiert. Die Gefäße wurden leicht geschüttelt, 15 min auf Eis stehengelassen, Zellreste und denaturierte Proteine 15 min mit 12000 x g (4 °C) abzentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde mit Phenol extrahiert, aus der wässrigen Phase mit 2 Volumenteilen Ethanol 30 min lang bei -20 °C die Nukleinsäuren präzipitiert und dann abzentrifugiert. Nach dem Lösen des Pellets in 50 µl TE wurde die RNA mit 50 µg RNase 15 min bei 37 °C hydrolysiert. Zur Entfernung der (Oligo)ribonukleotide wurde der Ansatz mit 33 µl 20 % PEG 6000/2.5 M NaCl versetzt, eine Stunde auf Eis inkubiert und die reine Plasmid-DNA durch Zentrifugation pelletiert

(HATTORI and SAKAKI, 1986). Auf diese Weise isolierte Plasmid-DNA ist hinreichend gereinigt, um gute Resultate bei der Plasmidsequenzierung zu liefern.

Alternativ hierzu wurde gelegentlich nach der "Boiling"-Methode (HOLMES and QUIGLEY, 1981) vorgegangen: Die Zellen einer 5 ml Übernachtskultur wurden pelletiert, in 400 µl STET-Puffer und 30 µg Lysozym aufgenommen, 1 min bei RT und 1 min im kochenden Wasserbad denaturiert. Die denaturierten Zellbestandteile wurden 15 min abzentrifugiert (1200 x g) und der Überstand mit einem Volumenteil Isopropanol 30 min bei -20 °C gefällt. Der Reinheitsgrad der Plasmidpräparation konnte durch zusätzliche Phenolisierung und RNase-Verdau, wie oben beschrieben, verbessert werden.

STET-Puffer: 8 % Saccharose, 5 % Triton x-100,
50 mM EDTA, pH 8.0, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0

8.2. Großansatz

Zur Isolierung großer Mengen Plasmid-DNA (pBR, pUC, klonierte cDNA) wurden 0.5-1 l DH1 amp- bzw. DH1 tet-Medium mit 1 % einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C geschüttelt. Pro Liter Bakterienkultur wurden, um die Ausbeute an Plasmid-DNA zu erhöhen, 170 mg Chloramphenicol zugegeben, sobald die Bakterienkultur eine O.D.₅₅₀ von 0.8 erreicht hatte und diese über Nacht bei 37 °C weiter inkubiert (MANIATIS et al., 1982). Die Chloramphenicol-Amplifikation erübrigte sich bei "high-copy" Plasmiden, zu denen pUC und pUC-Derivate gerechnet werden. Die Zellen wurden geerntet (SORVALL GSA-Rotor, 9000 rpm, 10 min, 4 °C), mit 60 ml TE-Puffer gewaschen, erneut pelletiert und lysiert (folgende Angaben beziehen sich auf 1 l Bakterienkultur):

- a. 20 ml Lysozymlösung mit 50 mM Glucose, 25 mM Tris-HCl, pH 8.0
10 mM EDTA, pH 8.0, 1 mg/ml Lysozym.
Pellet resuspendieren; 30 min auf Eis inkubieren.
- b. 40 ml Alkali-/SDS-Lösung: 1 % SDS, 0.2 N NaOH.
vorsichtig mischen; 5 min bei RT inkubieren.
- c. 30 ml Kaliumacetat (3 M), pH 4.8
vortexen; 60 min auf Eis inkubieren.

Die lysierten Zellen wurden bei 17000 rpm 50 min lang bei 4 °C in einem SORVALL SS34-Rotor abzentrifugiert und der Überstand mit einem Volumenteil Isopropanol bei -20 °C präzipitiert. Das nach Zentrifugation (12000 rpm, 30 min, 4 °C, SS34-Rotor) erhaltene Pellet wurde in 10 ml TE-Puffer aufgenommen und zunächst 30 min lang mit 0.5 mg RNase, dann weitere 30 min mit 0.5 mg Proteinase K, jeweils bei 37 °C, inkubiert. Nach Phenolisierung und Alkoholfällung erfolgte die Auftrennung des vorgereinigten Nukleinsäuregemisches in RNA, Supercoil Plasmid-DNA, Open circle Plasmid-DNA und bakterienchromosomale DNA im Cäsiumchloridgradienten. Das Nukleinsäurepellet wurde hierzu in 4 ml H₂O gelöst, mit 4 mg CsCl sowie 170 µl Ethidiumbromid (20 mg/ml) versetzt und in einem SORVALL Vertikalrotor VT865 bei 18 °C, 47000 rpm, 16 Stunden ultrazentrifugiert. Die Plasmidbande wurde durch seitliche Punktion des Zentrifugenröhrchens mit einer Spritze entnommen und die Lösung zur Entfernung des Ethidiumbromids etwa 6 mal mit gleichen Volumina wassergesättigten n-Butanols extrahiert (MANIATIS et al., 1982). Die wässrige Phase der letzten Extraktion wurde zunächst, um die Cäsiumchloridkonzentration herabzusetzen, mit 2 Volumenteilen H₂O verdünnt und die Plasmid-DNA anschließend durch Fällung mit 2 Volumenteilen Ethanol konzentriert.

Die Ausbeute an DNA betrug, je nach Plasmid, zwischen 0.7 und 2.5 mg pro 1 Bakterienkultur.

9. Restriktionsspaltungen, DNA-Gele und Southernblotting

9.1. Restriktionsspaltungen und Dephosphorylierung

Die DNA wurde in dem von den Herstellerfirmen angegebenen Puffern gespalten. Für analytische Zwecke wurden 0.5-2 µg Plasmid-DNA mit 2-20 Enzymeinheiten 1-3 Stunden bei 37 °C verdaut. Restriktionsspaltungen mit den Enzymen Sma I und Taq I fanden jedoch bei 30 °C bzw. 65 °C statt, das Reaktionsvolumen lag zwischen 10 und 20 µl. Zum Abstoppen der Reaktion wurde Probenauftragspuffer zugegeben.

Für präparative Zwecke wurden die Bedingungen den eingesetzten DNA-Mengen angepaßt.

Je nach Verwendungszweck der restringierten DNA folgte im Anschluß an die Spaltung die Dephosphorylierung der 5'-Enden: 20 µl Restriktionsansatz wurden mit 1 µl RAP-Puffer (20 x konzentriert) und 1 U alkalischer Phosphatase versetzt. Nach einer Inkubationsdauer von 45 min bei 37 °C wurde die Phosphatase weitere 45 min in 10 mM Trinitriloacetat bei 65 °C inaktiviert, die DNA danach phenolisiert und präzipitiert (MANIATIS et al., 1982).

Probenauftragspuffer: 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM EDTA, pH 8.0, 1 % SDS, 0.1 mg/ml Bromphenolblau, 25 µg/ml Xylencyanol, 30 % Glycerin.

RAP-Puffer (20 x konz.): 1 M Tris-HCl, pH 9.0, 20 mM MgCl₂, 2 mM ZnCl₂, 20 mM Spermidin.

9.2. Agarosegele

DNA-Fragmente wurden in horizontalen (10 x 8 x 0.3 cm) oder vertikalen (13 x 19 x 0.3 cm) Agarosegelen bei 6 V/cm im Tris/Acetat-Puffer-System aufgetrennt. Je nach Fragmentgröße lagen die Agarosekonzentrationen zwischen 1 und 1.5 % (MANIATIS et al., 1982). Nach dem Lauf wurden die Gele in

1 µg/ml Ethidiumbromid gefärbt, die Banden mit einer UV-Lampe bei der Wellenlänge 302 nm sichtbar gemacht und mit POLAROID Filmen (Typ 667/3000 ASA) oder ILFORD HP5 Filmen (400 ASA) photographiert. Als Eichstandard zur Längenbestimmung der DNA-Fragmente dienten die Pst I-Restriktionsfragmente der DNA des Phagen λ .

Tris/Acetat-Puffer: 40 mM Tris-Acetat, pH 7.8, 5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA (MANIATIS et al., 1982).

Längen der Pst I-Restriktionsfragmente von λ -DNA (bp):

11497	/	5077	/	4749	/	4507	/	2838	/	2560	/	2459	/	2443	/	2140	/	1986
1700	/	1159	/	1093	/	805	/	514	/	468	/	448	/	339	/	264	/	247
216	/	211	/	200	/	164	/	150	/	94	/	87	/	72	/	15		

9.3. Polyacrylamidgelle

Für die genaue Größenanalyse kleiner DNA-Fragmente (<500 bp) war die Auftrennung in 8 % Polyacrylamidgelen (18 x 1.5 cm) in TBE-Puffer notwendig (MANIATIS et al., 1982). Die Elektrophorese erfolgte bei 8 V/cm. Nach dem Lauf wurden die Banden, wie für die Agarosegele beschrieben, gefärbt und photographiert.

TBE-Puffer: 89 mM Tris, 89 mM Borsäure, pH 8.3, 2 mM EDTA, pH 8.0

9.4. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Gelen

DNA-Fragmente wurden, je nach Länge, in Agarose- oder Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Isolierung von Fragmenten aus Agarosegelen wurde DEAE-Ionenaustauschermembran verwendet (SCHLEICHER & SCHÜLL, Protokoll 205): Die DNA-Banden wurden nach dem Lauf gefärbt, die in H₂O angefeuchtete Membran etwa 0.5 cm hinter der zu isolierenden Bande in das Gel gesteckt und die Elektrophorese bei doppelter Spannung fortgesetzt, bis sich die gewünschte

Bande auf der Ionenaustauscher-Membran befand. Die Elution der DNA von der Membran erfolgte 45 min lang bei 65 °C in 250 µl High-Salt-NET-Puffer. Die Membran wurde einmal in 50 µl High-Salt-NET-Puffer bei RT nachgewaschen, die beiden Eluate vereint und die DNA nach Zugabe von 2 Volumenteilen Ethanol präzipitiert.

High-Salt-NET-Puffer: 1 M NaCl, 0.1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 % SDS.

In Polyacrylamidgelen aufgetrennte Fragmente wurden direkt aus den Gelen eluiert (MAXAM and GILBERT, 1980). Nach der Elektrophorese wurde die Gelbande herausgeschnitten, in einem Eppendorfgefäß mazeriert und in etwa 1 Volumenteil Elutionspuffer (0.5 M Ammoniumacetat, 1 mM EDTA, pH 8.0) suspendiert. Die Elution der DNA in den Puffer erfolgte über Nacht bei RT. Die Gelreste wurden durch Zentrifugation abgetrennt (12000 x g, 10 min, RT) und die im Überstand enthaltene DNA über eine Sephadex G-50 fine-Säule (0.7 x 4 cm) nachgereinigt. Aus dem Säuleneluat wurde die DNA anschließend präzipitiert.

9.5 Southernblotting

Nach der Auftrennung der DNA-Fragmente in 1 bis 1.5 %igen Agarosegelen wurde das Gel in 0.25 N HCl 10 min partiell depuriniert (WAHL et al., 1979), zweimal je 15 min in 0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl denaturiert und danach zweimal 30 min in 0.5 M Tris-HCl, pH 7.5, 1.5 M NaCl neutralisiert. Der Transfer der DNA-Banden aus dem Gel auf Nitrocellulosefilter erfolgte in einem Kapillarstrom von 20 x SSC (3 M NaCl, 0.3 M Natriumcitrat) als Transferpuffer. Der schichtweise Aufbau der Blotting-Vorrichtung ist andernorts genau beschrieben (SOUTHERN, 1975). Nach einer Transferdauer von etwa 16 Stunden wurde der Nitrocellulosefilter 30 min in 2 x SSC (0.3 M NaCl, 0.03 M Natriumcitrat) gewaschen, luftgetrocknet und

die DNA-Banden während des zweistündigen Backens bei 80 °C auf dem Filter fixiert.

10. Radioaktive Markierung der DNA

10.1. Nick-Translation

DNA-Fragmente wurden durch Nick-Translation (RIGBY et al., 1977) in folgendem Reaktionsansatz radioaktiv markiert:

50 mM Tris-HCl, pH 7.5
10 mM MgCl₂
1 mM DTT
je 62.5 µM dCTP, dGTP, dTTP
30-50 µCi α ³²P-dATP (3000 Ci/mM)
0.2-1 µg DNA-Fragmente
0.2 ng DNase I
10 U E. coli DNA-Polymerase I
H₂O ad 40 µl.

Nach einer Reaktionsdauer von 90 min bei 16 °C wurden die Enzyme mit 5 µl EDTA (0.2 M), pH 8.0 inaktiviert. Nicht eingebautes α ³²P-dATP wurde durch Chromatographie über Sephadex G-50 fine Säulen (0.7 x 4 cm) von der markierten DNA abgetrennt (MANIATIS et al., 1982): Die radioaktiv markierten DNA-Fragmente wurden mit 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0, in 200 µl Portionen eluiert und die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen durch Flüssigkeitszintillationsmessung bestimmt. Die Fraktionen mit den höchsten Radioaktivitätswerten wurden für die Hybridisierung eingesetzt.

Ausbeute: $1-6 \times 10^7$ cpm/µg DNA.

10.2. Endmarkierung von synthetischen Oligonukleotiden

Die 17 mer Oligonukleotide waren auf einem DNA-Synthesizer der Firma APPLIED BIOSYSTEMS nach der Phosphoramidit-Methode (DÖRPER and WINNACKER, 1983) hergestellt worden. Basenspezifische Schutzgruppen sowie die Schutzgruppe am 5'-Ende des Oligonukleotids waren bereits abgespalten und das Oligonukleotid über HPLC gereinigt. Es konnte also ohne weitere Behandlungen zur 5'-Endmarkierung mit radioaktivem $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP verwendet werden. Die Reaktion wurde, wie bei WOODS (1984) beschrieben, mit geringfügigen Modifikationen durchgeführt:

60 mM Tris-HCl, pH 7.6
10 mM MgCl_2
10 mM DTT
5 U T4 Polynukleotidkinase
8.5 pM 5'-Enden der Oligonukleotide
.30 μCi $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP
ad 20 μl H_2O .

Der Ansatz wurde bei 37 °C 60 min inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 1 μl EDTA (0.2 M), pH 8.0 abgestoppt. Nicht eingebaute radioaktive Nukleotide wurden über DEAE-Cellulose DE-52 Säulenchromatographie (Säule: 0.7 x 4 cm) entfernt (MANIATIS et al., 1982). Das Säulenmaterial war mit 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 0.2 M NaCl äquilibriert. Vor dem Auftragen der Probe wurden 10 μl NaCl (1 M) und 20 μl TE-Puffer zur Kinase-Reaktion gegeben. Mononukleotide wurden zunächst mit 0.2 M NaCl/TE-Puffer von der Säule eluiert, die Oligonukleotide mit 1 M NaCl/TE als Elutionspuffer. Die Fraktionen mit den höchsten Radioaktivitätswerten wurden wiederum über Flüssigkeitsszintillationsmessung ermittelt und vereinigt.

Ausbeute: durchschnittlich 2×10^7 cpm/50 ng DNA.

11. Screening von cDNA-Genbanken

Die auf Nitrocellulosefilter ausplattierten und bei -70°C eingefrorenen cDNA-Klone mußten zunächst auf Replikafiltern vermehrt und auf ihnen sodann lysiert werden, damit die Plasmid-DNA für die Hybridisierungsprobe zugänglich wurde.

11.1. Koloniefixierung auf Nitrocellulosefiltern

Bei der Herstellung der Replikafilter wurde nach HANAHAN und MESELSON (1980) vorgegangen: Masterfilter und Replikafilter wurden getrennt, auf den die ursprünglichen Kolonien tragenden Masterfilter ein neuer Nitrocellulosefilter gelegt und durch Zusammendrücken der Filter ein zweites Replika des Koloniemusters hergestellt. Master- und Replikafilter waren eindeutig in ihrer Orientierung markiert worden. Die Masterfilter wurden wieder bei -70°C eingefroren, die Replikafilter auf Antibiotikum-haltige Agarplatten aufgelegt und die Kolonien bei 37°C bebrütet, bis sie zu einer Größe von etwa 1 mm herangewachsen waren.

Zur Lysis der Bakterien wurden die beschrifteten Nitrocellulosefilter in der unten angegebenen Reihenfolge mit verschiedenen Lösungen behandelt. Die Filter wurden hierzu jeweils auf WHATMAN 3MM Papier gelegt, das mit der entsprechenden Lösung gut durchtränkt war (THAYER, 1979):

- a. 1.5 mg Lysozym/ml in 25 % Sucrose, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0.
(Lysis der Bakterien, bei 4°C).
- b. 0.2 % Triton x-100, 0.5 N NaOH
(1. Denaturierungsschritt, bei RT)
- c. 0.5 N NaOH
(2. Denaturierungsschritt, bei RT)
- d. 1 M Tris-HCl, pH 7.5
(1. Neutralisierungsschritt, bei RT)
- e. 0.1 M Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 M NaCl
(2. Neutralisierungsschritt, bei RT)

Die Filter wurden jeweils 3 mal 1 min lang auf der Lösung belassen, danach luftgetrocknet und schließlich 2 Stunden lang bei 80 °C die DNA auf den Filtern hitzefixiert. Zur Entfernung der Bakterienreste wurde anschließend 16 Stunden bei 65 °C in 3 X SSC, 0.1 % SDS im Schüttelwasserbad gewaschen (WOODS, 1984) und die Filter trocken bei RT gelagert.

11.2. Koloniehybridisierung

Nick-translatierte DNA als Hybridisierungsprobe

Die Filter wurden in 2 x SSC angefeuchtet und dann in Prähybridisierungslösung 4-6 Stunden bei 42 °C inkubiert. Die Prähybridisierungslösung hatte folgende Zusammensetzung:

- 50 % Formamid (deionisiert mit BIORAD AG501-X08)
- 6 x SSC
- 5 x Denhardt's Lösung
- 0.1 % SDS
- 100 µg/ml denaturierte Lachs-DNA

Die durch Nick-Translation radioaktiv markierte DNA-Probe wurde 10 min bei 100 °C denaturiert, auf Eis abgekühlt und dem Hybridisierungspuffer zugegeben. Der Hybridisierungspuffer setzte sich wie der Vorhybridisierungspuffer zusammen, er enthielt darüber hinaus Dextransulfat (10 % w/v) (WAHL et al., 1979). Für die Hybridisierung von etwa 14 Koloniefiltern (Ø 82 cm) wurden 15 ml Hybridisierungslösung mit circa 2×10^7 cpm radioaktiv markierter DNA eingesetzt, Filter und Lösung in Folie eingeschweißt und über Nacht bei 42 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Unspezifisch gebundene DNA wurde durch Waschen der Filter in 0.1 x SSC, 0.1 % SDS zweimal 10 min bei RT, zweimal 30 min bei 65 °C - entfernt. Die Filter wurden feucht in Haushaltsfolie eingepackt und mit Intensifizier Screens bei -70 °C zwischen 1 und 24 Stunden autoradiographiert.

Synthetische 17-mer Oligonukleotide als Hybridisierungsprobe

Hybridisierungen mit kurzen Nukleinsäurefragmenten erfordern besonders stringente Hybridisierungsbedingungen, um unspezifische Bindung der Sonden-DNA zu vermeiden. Auf Nitrocellulosefilter fixierte DNA wurde zunächst 6 Stunden bei 40 °C prähybridisiert in (WOODS et al., 1982):

6 x SSC
0.5 % SDS
100 µg/ml denaturierte Lachs-DNA
5 x Denhardt's Lösung
0.05 % (w/v) Natriumpyrophosphat

Zur Hybridisierung wurde der Prähybridisierungspuffer mit $1-2 \times 10^6$ cpm/ml substituiert und bei 40-42 °C inkubiert.

Die Waschtemperatur für die Filter war so gewählt, daß perfekte Hybride stabil verbunden blieben, falsche Hybride hingegen abgelöst wurden. Für gemischte Oligonukleotidproben, wie sie in den Versuchen verwendet wurden, liegt die optimale Waschtemperatur bei der niedrigsten T_D ($= T_{Dmin}$), die sich aus der Basenzusammensetzung der enthaltenen Oligonukleotide berechnet (SZOSTAK et al., 1979):

$$T_D = 4 \text{ °C je G/C-Basenpaar} + 2 \text{ °C je A/T-Basenpaar}$$

Aus der Basenzusammensetzung der Oligonukleotidgemische errechneten sich folgende T_{Dmin} und T_{Dmax} Werte:

"Kupfer-A"- Oligonukleotidprobe: $T_{Dmin} = 50 \text{ °C}$
 $T_{Dmax} = 56 \text{ °C}$
"Kupfer-B"-Oligonukleotidprobe: $T_{Dmin} = 50 \text{ °C}$
 $T_{Dmax} = 58 \text{ °C}$

Die Filter wurden zunächst zweimal 15 min bei RT, dann unter stringenten Bedingungen 5 min bei 50 °C, jeweils in 6 x SSC, 0.1 % SDS, gewaschen, feucht in Haushaltsfolie eingepackt und mit Röntgenfilmen und Verstärkerfolien zwischen 2 und 48 Stunden bei -70 °C exponiert. Bei Bedarf wurden die Filter bei höherer Temperatur nachgewaschen.

11.3. Reinigung positiver Klone

Bereiche auf den Nitrocellulosefiltern, die positiven Hybridisierungssignalen entsprachen, konnten mit Hilfe der Orientierungsmarken wiedergefunden werden. Dazu wurden die Bakterienkolonien erneut auf einem Replikafilter hochgezogen und die Klone in der Umgebung des Signals mehrfach auf Antibiotikum-haltige Agarplatten in einer Rasteranordnung umgesetzt. Die Kolonien wurden hochgezüchtet, von einer der Parallelplatten wiederum Filterreplikas hergestellt und, wie oben beschrieben, die Replikas lysiert und hybridisiert. Positive Hybridisierungssignale konnten nun leicht im Raster einem individuellen Klon zugeordnet werden. Der positive Klon wurde anschließend von der bei 4 °C gelagerten Parallelplatte abgeimpft, die Plasmid-DNA isoliert und im Southern-Blot rehybridisiert.

12. Hybridisierung von Southern- und Northern-Blots

12.1. Hybridisierung mit nick-translatierter Proben-DNA

Prähybridisierung und Hybridisierung von transferierter, filtergebundener DNA (Southern-Blots) wurde unter den gleichen Bedingungen durchgeführt, die für die Hybridisierung von Koloniefiltern beschrieben worden waren (B.11.2.).

Für Northern-Blots wurden hingegen folgende Bedingungen gewählt (THOMAS, 1980): Die Prähybridisierung fand in

50 % Formamid (deionisiert w.o.)
5 x SSC
50 mM Natriumphosphat, pH 6.5
10 x Denhardt's Lösung
250 µg/ml denaturierter Lachs-DNA

bei 42 °C 16 Stunden lang statt. Zur Hybridisierung wurde dem Prähybridisierungspuffer die hitzedenaturierte (10 min, 100 °C), radioaktive DNA-Probe (2.5×10^7 cpm/5 ml Hybridisi-

sierungslösung) und 10 % (w/v) Dextransulfat zugegeben und 24 Stunden bei 42 °C inkubiert. Die Waschbedingungen wurden wie folgt gewählt (THOMAS, 1980):

4 mal 5 min in 2 x SSC, 0.1 % SDS bei RT
2 mal 15 min in 0.1 x SSC, 0.1 % SDS bei 50 °C

Die Autoradiographie erfolgte über Nacht bei -70 °C mit Intensifizier Screens.

12.2. Hybridisierung mit Oligonukleotidproben

Prähybridisierung und Hybridisierung von DNA-Proben auf Nitrocellulosefiltern (Southern-Blots) wurde so durchgeführt, wie dies bereits im Punkt B.11.2. für die Hybridisierung von Koloniefiltern mit radioaktiv mit $\gamma^{32}\text{P}$ -markierten Oligonukleotiden beschrieben wurde.

13. Subklonierung in M13-Phagen

13.1. Subklonierung

Die replikative, doppelsträngige Form der M13-Phagen mp8, 9, 10 und 11 (MESSING, 1983) wurde mit den entsprechenden Restriktionsenzymen in der "Multiple Cloning Site (MCS)" gespalten. Wurde der Vektor mit nur einer Restriktionsendonuklease behandelt, so wurden die Enden der DNA zusätzlich dephosphoryliert. Zur Ligation mit cDNA-Subfragmenten, die nach Restriktion aus Agarose- oder Polyacrylamidgelen isoliert worden waren, wurde jeweils ein etwa 3-facher molarer Überschuß an Vektor-DNA eingesetzt. Ungeachtet, ob überhängende oder glatte Enden zu ligieren waren, fand die Ligrationsreaktion über Nacht bei 16 °C statt. Der Ligationsansatz hatte folgende Zusammensetzung:

50 mM Tris-HCl, pH 7.6
10 mM MgCl₂
1 mM ATP
1 mM DTT
5 % (w/v) Polyethylenglykol 8000
300 ng linearisierte M13-DNA
ca. 20 ng restringiertes DNA-Fragment
1 U T4 DNA-Ligase
Reaktionsvolumen : 20 µl

Die anschließende Transformation fand nach der CaCl₂-Methode statt (MANDEL and HIGA, 1970): Eine Kolonie des Stammes E. coli JM103 (MESSING, 1983) oder JM109 (YANISCH-PERRON et al., 1985), der auf Glucose-Minimalmediumplatten selektio- niert worden war (MESSING, 1983), wurde über Nacht bei 37 °C in 10 ml 2 x TY-Medium vermehrt, am nächsten Tag 1:20 in 2 x TY-Medium überimpft und die Kultur bis zu einer O.D.₅₅₀ von 0.3 bei 37 °C geschüttelt. Gleichzeitig wurden 20 ml 2 x TY-Medium mit einem Tropfen der JM103/JM109-Übernacht- kultur angeimpft und bei 37 °C inkubiert. Diese Kultur lie- ferte den Bakterienrasen für die M13-Phagen. Zur Kompetenz- induktion wurden 40 ml JM103/JM109-Kultur abzentrifugiert (7000 x g, 4 °C, 5 min), sobald die erwünschte O.D.₅₅₀ von 0.3 erreicht war. Das Zellpellet wurde in 20 ml eiskaltem 50 mM CaCl₂ suspendiert, 20 min auf Eis inkubiert, die Zel- len erneut wie oben pelletiert und nun in 4 ml eiskaltem 50 mM CaCl₂ aufgenommen.

300 µl dieser mit CaCl₂ behandelten Zellen wurden mit 5 µl Ligationsansatz versetzt und 40 min auf Eis stehenge- lassen. Nach dem Hitzeschock (42 °C, 3 min) wurden zum Transformationsansatz 200 µl JM103-bzw. 109-Zellen der 20 ml- Kultur gegeben, sowie 40 µl IPTG (100 mM), 40 µl-X Gal (2 % in Dimethylformamid) und 3 ml Topagar (45 °C). Die einzelnen Komponenten wurden gut gemischt und auf eine vorgewärmte H- Agarplatte (37 °C) verteilt. Nach Erstarren der Topagar- schicht wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert. Positive, re- kombinante Klone waren nach etwa 14 Stunden Wachstum an der trüben, weißen Färbung der Plaques erkennbar, der nicht re-

kombinierte DNA enthaltende Background an der blauen Färbung der Plaques. Zur Kontrolle wurde auch mit gespaltener und religierter Vektor-DNA transformiert.

13.2. Isolierung von M13-Phagen-Einzelstrang-DNA

Zur Isolierung von einzelsträngiger M13-Phagen-DNA (MES-SING, 1983) wurde 1 ml einer Übernachtskultur von JM103/109-Zellen 1:100 mit 2 x TY-Medium verdünnt, davon je 1.5 ml mit einem M13-Phagen-Plaques angeimpft und bei 37 °C 5 Stunden geschüttelt. Die Zellen wurden danach 5 min bei 12000 x g abzentrifugiert und aus dem Überstand die Phagen mit 200 µl 20 % PEG 6000, 2.5 M NaCl präzipitiert. Nach 15-minütiger Fällung wurden die Phagen pelletiert (10 min, 12000 x g, 4 °C), das resultierende Pellet gut von PEG/NaCl-Rückständen gereinigt und in 100 µl TE-Puffer suspendiert. Zur Entfernung der Phagen-Proteinhülle folgten Extraktionen mit Phenol, Phenol/Chloroform und Chloroform. Aus der letzten, wässrigen Extraktionsphase wurde die reine M13-Einzelstrang-DNA mit Ethanol präzipitiert und das DNA-Pellet in 10 µl H₂O aufgenommen.

Ausbeute: Durchschnittlich 5-10 µg/1.5 ml Kultur.

14. Subklonierung in pUC-Plasmiden

Subfragmente von cDNAs wurden zu Hybridisierungs- und Sequenzierungszwecken in die MCS der Plasmidvektoren pUC8, pUC9 und pUC19 unterkloniert. Hierzu wurden, wie in Punkt 13 beschrieben, Vektor und cDNA restringiert und die kompatiblen Enden der DNAs ligiert. Es wurde wiederum mit 3-fachem molarem Überschuß an Vektor-DNA gearbeitet. Zur Transformation wurde 1/20 des Ligationsansatzes, sowie 100 µl kompetenter (B.7.3.) E. coli DH1-, JM109- oder DH5α-Zellen verwendet, die Selektion positiver, rekombinanter Kolonien er-

folgte für DH1-Zellen auf DH1 amp-Platten. Dienten DH5 α - oder JM109-Zellen als Empfängerstamm, so wurde zur Selektion auf amp/X-Gal-IPTG Agar ausplattiert: Plasmide mit eingebautem Insert konnten meist an der weißen Farbe der Kolonien identifiziert werden.

15. Konstruktion von Deletionsmutanten mit Exonuklease III/VII

Die Konstruktion von Deletionsmutanten zur Sequenzierung erfolgte im wesentlichen nach YANISCH-PERRON et al. (1985). Die zu sequenzierende DNA war stets in pUC19-Vektoren umklo- niert worden.

5 μ g der rekombinierten Plasmid-DNA wurden zur Erzeugung eines 3'-überhängenden und eines - für Exonuklease III-Abbau empfindlichen - 5'-überhängenden DNA-Endes nacheinander je- weils 3 Stunden mit den Restriktionsenzymen Kpn I und Bam HI restringiert. Die Vollständigkeit der ersten Restriktion wurde im Agarosegel überprüft. Nach Phenol-Extraktion und Ethanolgefällung wurde die linearisierte DNA zum Exonuklea- se III-Verdau in 50 μ l 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT aufgenommen und nach einer 5-minütigen Vorinkubati- on bei 37 °C die Reaktion durch Zugabe von 90 U Exonuklea- se III gestartet. In 1-Minuten-Intervallen wurden 2.5 μ l Proben dem Reaktionsansatz entnommen, mit 5 μ l H₂O versetzt und 10 min bei 70 °C inaktiviert.

Zum Abbau des überhängenden Gegenstranges wurden die Zeitproben mit einzelstrangspezifischer Exonuklease VII be- handelt. Dazu wurde folgender Reaktionsansatz hergestellt:

7.5 μ l Exonuklease III-verdaute DNA

2 μ l Exonuklease VII Puffer

(10 x konzentriert: 500 mM Kaliumphosphat, pH 7.0

80 mM EDTA

10 mM DTT)

0.2 U Exonuklease VII

H₂O ad 20 μ l.

Der Abbau wurde 45 min bei 37 °C durchgeführt, das Enzym anschließend bei 70 °C (15 min) hitzeinaktiviert. Von jeder zweiten Zeitprobe wurde ein Aliquot von 8 µl in einem 1.2-proz. Agarosegel auf das Ausmaß der Deletionen überprüft, mit den relevanten Proben wurde weitergearbeitet.

Die DNA dieser Proben - mit H₂O ad 20 µl aufgefüllt - wurde mit 1.5 µl MgCl₂ (0.2 M), 1 µl dNTP-Mix (jedes dNTP 8 mM), 1 U DNA-Polymerase I (Klenow Fragment) versetzt und die Enden der DNA-Stränge 30 min bei RT aufgefüllt. Dann wurde mit Phenol und Chloroform extrahiert und die DNA mit Ethanol gefällt. Danach wurde die DNA in Ligationspuffer (B.13.1.) aufgenommen und mit 2 U T4 DNA-Ligase über Nacht bei 16 °C in einem Reaktionsvolumen von 40 µl cyclisiert. Zur Transformation wurden kompetente (B.7.3.) JM109- oder DH5α-Zellen verwendet.

Ausbeute: 100-500 Klone/µl Ligationsansatz

16. DNA-Sequenzierungsmethoden

16.1. Plasmid-Sequenzierung nach der Dideoxymethode

Für die Plasmidsequenzierung (CHEN and SEEBURG, 1985; HATTORI and SAKAKI, 1986; HEINRICH, 1986) mußte zunächst das dsDNA-Template, das nach der Alkali-Aufschluß-Methode präpariert worden war, in die Einzelstrangform überführt werden. Dazu wurden 2 µg des RNA-freien Plasmids in 20 µl Denaturierungspuffer einer Endkonzentration von 0.2 M NaOH, 0.2 mM EDTA, pH 8.0 bei RT inkubiert, die Alkalibehandlung nach 5-15 min durch Zugabe von 1/10 Volumenteilen Ammoniumacetat, pH 4.5 (2 M) beendet, und die Einzelstrang-DNA mit 2 Volumenteilen Ethanol präzipitiert.

Die Hybridisierung von Plasmid-Einzelstrang und 17 mer Sequenzprimer fand unter folgenden Bedingungen statt:

- 2 pM M13-Universal- oder Reverse-Primer (2.5 ng/µl)
oder:
- 16 pM Hämocyanin-"Kupfer A"-Oligonukleotidgemisch
- 1.5 µl Klenow Puffer (10 x konz.: 100 mM Tris-HCl, pH 8.0
50 mM MgCl₂)
- 2 µg denaturierter pUC-Plasmid-Einzelstrang
- H₂O ad 10 µl.

Zum Primen der Sequenzreaktion wurden folgende Oligonukleotide eingesetzt:

- M13-Universalprimer: 5' - GTAAAACGACGGCCAGT - 3'
- M13-Reverse-Primer: 5' - AACAGCTATGACCATGA - 3'
- Hc-"Kupfer A"-Oligonukleotid: 5' - CA_T^CCA_T^CTGGCA_T^CTGGCA - 3'

Nach 15-minütigem Annealing bei 55 °C konnte mit der Sequenzreaktion gestartet werden (B.16.3.).

16.2. Sequenzierung in M13-Vektoren nach der Dideoxymehtode

War die zu sequenzierende DNA bereits in M13-Vektoren umkloniert worden, so erübrigte sich der Denaturierungsschritt des DNA-Templates. 800 ng rekombinierte M13-ssDNA wurden direkt zum Annealing mit dem Sequenzprimer eingesetzt:

- 1 pM M13-Universalprimer (2.5 ng/µl)
- 1.5 µl Klenow Puffer (10 x konz., s. o.)
- 800 ng M13-ssDNA
- H₂O ad 10 µl.

Zur Hybridisierung wurde der Annealing-Ansatz 50-60 min bei 55 °C inkubiert und war dann sequenzierbereit.

16.3. Sequenzierungsreaktionen

Es wurde mit folgenden Deoxy- und Dideoxynukleotidgemischen gearbeitet:

dNTP Stammlösungen	je 10 mM in H ₂ O
dNTP Arbeitslösungen:	je 0.5 mM in H ₂ O
ddNTP Stammlösungen:	je 10 mM in H ₂ O
ddNTP Arbeitslösungen:	0.15 mM (ddATP) in H ₂ O
	0.15 mM (ddCTP) in H ₂ O
	0.20 mM (ddGTP) in H ₂ O
	0.50 mM (ddTTP) in H ₂ O
Chase Lösung:	jedes dNTP 0.5 mM in H ₂ O

Zusammensetzung der Deoxynukleotidgemische

	A°Mix	C°Mix	G°Mix	T°Mix
0.5 mM dCTP	20 µl	1 µl	20 µl	20 µl
0.5 mM dGTP	20 µl	20 µl	1 µl	20 µl
0.5 mM dTTP	20 µl	20 µl	20 µl	1 µl
TE-Puffer	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl

dATP wurde ausschließlich in Form von $\alpha^{35}\text{S}$ -dATP der Dideoxy-Reaktion zugesetzt.

Die Deoxy-/Dideoxynukleotidgemische wurden jeweils aus gleichen Volumenteilen ddNTP-Arbeitslösung und entsprechendem N°-Gemisch hergestellt (SANGER et al., 1977).

Der Annealing-Mix wurde mit 1 U DNA-Polymerase I / Klenow Fragment (1 U/µl) sowie 10 µCi $\alpha^{35}\text{S}$ -dATP (400 Ci/mM) versetzt und jeweils 2.5 µl des Gemisches zu je 2 µl basenspezifischer Reaktionsmischung gegeben. Die Reaktionsgemische wurden durch Abzentrifugieren vereint und 20 min bei 37 °C inkubiert, danach 2 µl Chase-Lösung für 15 min zugegeben. Zur sofortigen Analyse der Sequenzresultate im Gel wurden 1.5 µl-Proben den einzelnen Sequenzreaktionen entnommen und mit 1 µl Formamid-Stopplösung (95 % Formamid, deionisiert, 20 mM EDTA, pH 8.0, 0.1 % Bromphenolblau, 0.1 % Xylencyanol) versetzt. Das restliche Probenmaterial wurde bei -20 °C eingefroren.

Molaritäten der basenspezifischen Reaktionsgemische

	dATP/ddATP	dCTP/ddCTP	dGTP/ddGTP	dTTP/ddTTP
α ^{35}S -dATP (μM)	1.4	1.4	1.4	1.4
dCTP (μM)	62	4	85	85
dGTP (μM)	62	85	4	85
dTTP (μM)	62	85	85	4
ddATP (μM)	75	-	-	-
ddCTP (μM)	-	65	-	-
ddGTP (μM)	-	-	100	-
ddTTP (μM)	-	-	-	250

16.4. Sequenzgele

Die Sequenzreaktionsprodukte wurden in denaturierenden, 6 % Polyacrylamidgelen (Acrylamid:Bisacrylamid = 20:1) mit 7 M Harnstoff in TBE-Puffer (MANIATIS et al., 1982) aufgetrennt. Die Gele hatten eine Länge von 45 cm, die Geldicke nahm von oben (0.1 mm) nach unten (0.4 mm) zu. Durch Gelgradienten und ^{35}S -dNTP kann die Bandenauftrennung pro Elektrophoreselauf wesentlich erhöht werden (BIGGIN et al., 1983). Die Thermostatisierungsplatte wurde jedesmal frisch silikonisiert, die Ausschnittplatte mit Bind-Silan behandelt (GAROFF and ANSORGE, 1984). Nach dem Gießen und der Polymerisation des Gels wurde 20-30 min eine Vorelektrophorese bei 20-23 mA durchgeführt, die Sequenzierungsproben 3 min bei 95 °C denaturiert und unter Verwendung von "Haifisch"-Kämmen mit Mikrokapillaren auf das Gel aufgetragen. Die eigentliche Elektrophorese lief bei einer konstanten Stromstärke von 28-30 mA in 1 x TBE Puffer (B.9.3.), das Gel wurde während des Laufs gleichmäßig auf 55 °C temperiert (LKB Macromould). Nach dem Lauf wurden Thermostatisierungsplatte und Ausschnittplatte getrennt, das kovalent auf die Ausschnittplatte gebundene Gel in 10 % Essigsäure 10-20 min fixiert, 2-4 Stunden bei 80 °C getrocknet und, in der Regel, über Nacht bei RT autoradiographiert.

C. ERGEBNISSE

I. Nachweis der Hämocyaninbiosynthese im Herzgewebe durch in vitro-Translation isolierter RNA

1. Kenntnisstand zum Biosyntheseort

KEMPTER (1983,1986) konnte in seinen Experimenten eindeutig das Herz der Vogelspinne *Eurypelma californicum* als Biosyntheseort für Hämocyanin identifizieren. Hämocyanin wurde immunfluorometrisch und histochemisch in Herzschnittpräparaten nachgewiesen: Massive Ansammlungen hämocytähnlicher, kernhaltiger Zellen wurden in erster Linie auf den in das Herzlumen reichenden Muskelsepten angetroffen. Wie histochemische Nachweise zeigten, enthielten diese Zellen ebenfalls das für das funktionelle Hämocyanin unentbehrliche Kupfer. KEMPTER beobachtete ferner, daß Hämolymphentnahme die Hämocysten der Herzzinnenwand stark zur Vermehrung anregte. Gewebeproben mit proliferierenden Hämocysten wurden von ihm entnommen und in vitro mit radioaktivem ^3H -Leucin zur Proteinbiosynthese inkubiert. In diesen in vitro-Inkubaten wurden alle Untereinheiten des Hämocyanins synthetisiert, wie die Analyse der radioaktiv markierten und mit Antiserum gegen *Eurypelma*-Hämocyanin immunpräzipitierten Polypeptidketten in denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelen zeigte.

2. Bisherige Befunde

Ausgehend von diesem Wissensstand wurde in einer vorangegangenen Diplomarbeit (VOIT, 1984) zunächst die Isolierung von Hämocyanin-mRNA und ihre Translation in vitro beschrieben. Zur Isolierung intakter RNA hatte sich die Guanidiniumisothiocyanat-Cäsiumchlorid-Methode (CHIRGWIN et al., 1979) als geeignet erwiesen. Diese Vorversuche hatten ergeben, daß

die RNA-Ausbeute äußerst niedrig war, wenn lediglich die an der Herzzinnenwand der Tiere haftenden Hämocyten zur RNA-Extraktion verwendet wurden. Die anschließende Anreicherung von poly(A)⁺-RNA mittels Oligo(dT)-Affinitätssäulen erwies sich wegen der geringen Menge an Gesamt-RNA als problematisch. Auf diesen Schritt wurde daher in allen nachfolgenden Experimenten verzichtet. Zum anderen wurde in diesen Versuchen nun das ganze, homogenisierte Herz anstelle isolierter Hämocyten als Ausgangsmaterial zur RNA-Extraktion verwendet.

Zunächst wurden die Translationen in vitro wiederholt und die Immunpräzipitation der in vitro translatierten Polypeptidketten in ihrer Spezifität verbessert.

3. Isolierung von RNA mittels der Guanidiniumisothiocyanat-Cäsiumchlorid-Methode

Zur Isolierung von RNA für die Translationen in vitro und die cDNA-Synthese wurde das gesamte Herzgewebe einschließlich Pericard von jeweils einem Einzeltier in 4 M Guanidiniumisothiocyanat, einem sehr effektivem Proteindetergens (CHIRGWIN et al., 1979), zerkleinert und dann homogenisiert. Das Gewebehomogenat wurde anschließend durch Ultrazentrifugation durch ein Cäsiumchloridkissen, unter Ausnutzung der jeweils unterschiedlichen Dichten, in seine wesentlichen Zellkomponenten aufgetrennt: denaturierte Proteine (1.3 g/cm³) und Lipide als oberste Schicht des Gradienten, Polysaccharide (1.67 g/cm³), DNA (1.7 g/cm³) und RNA (1.9 g/cm³) (FLAMM et al., 1972). Aufgrund ihrer hohen spezifischen Dichte pelletiert RNA, nur kleine RNA-Moleküle wie tRNA (70-85 Nukleotide), 5 S rRNA (150 Nukleotide) und niedermolekulare mRNAs sind nicht quantitativ im RNA-Pellet enthalten.

Für die Versuche wurden vorzugsweise große Vogelspinnen ausgewählt. Das Gewicht der Tiere schwankte zwischen 10 und 15.5 g. 5 Tage vor der Präparation wurde durch Entnahme von

Versuchstier (g)	Herzgewebe (mg)	Gesamt-RNA (μ g)	ng RNA pro mg Herzgewebe
14.8	105	73	380
12.1	85		
15.5	135	60	444
10.0	72	24	333
10.5	78	20	256
13.6	80	36	450
12.0	105	44	419
11.5	95	41	432
12.0	98	29	296

Tabelle 1: Angaben zum Gewicht der verwendeten Versuchstiere, zur Menge an isoliertem Herzgewebe, sowie zur Gesamt-RNA Ausbeute.

etwa 300 μ l Hämolymphe die Hämocytenproliferation angeregt (KEMPTER, 1983). In Tabelle 1 sind Gewicht der verwendeten Versuchstiere, des entnommenen Herzgewebes und die daraus isolierte RNA-Menge zusammengestellt. Durchschnittlich wurden 376 ng Gesamt-RNA pro mg Herzgewebe isoliert. Die Reinheit der RNA-Isolate wurde durch UV-Absorptionsspektren zwischen 220 nm und 320 nm, sowie durch den Quotienten der Absorptionswerte bei 260 nm und 280 nm überprüft. Die ermittelten $E_{260/280}$ Werte lagen, nach Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung, zwischen 2.05 und 2.35.

Sowohl für die Translationen in vitro als auch zur cDNA-Synthese wurde unfractionierte Gesamt-RNA eingesetzt.

4. In vitro-Translation isolierter Herzgewebe-RNA in Kaninchenreticulocyten-Lysaten

Die Translationsversuche in vitro wurden mit einem kommerziell erhältlichen, Nuklease-behandelten Reticulocyten-Lysat (BRL) durchgeführt, dem pro Versuchsansatz 6-8 μ g Gesamt-RNA aus Eurypelma-Herz zugegeben wurde. In Kontrollex-

perimenten wurden die endogene Restaktivität des Lysates und die Translationsaktivität für Globin-mRNA getestet. Zur radioaktiven Markierung der Translationsprodukte diente ^{35}S -Methionin (1200 Ci/mM), eine Aminosäure, die nach den bisherigen Primärstrukturanalysen in den Hämocyaninuntereinheiten ausreichend repräsentiert ist: 18 Methionine (2.9 %) pro UE e (SCHNEIDER et al., 1983), 14 Methionine (2.2 %) pro UE d (SCHARTAU et al., 1983), sowie 14 Methionine (2.3 %) pro UE a (SCHARTAU et al., 1986).

Der Zusatz von 6 μg Eurypelma Herz-RNA zu 10 μl Reticulocyten-Lysat resultierte in 650000 ± 67000 cpm ($n=5$) TCA-fällbarer, in Proteine eingebauter Radioaktivität. Die endogene Restaktivität pro 10 μl Lysat betrug 77370 ± 2170 cpm ($n=3$). Demnach bewirkte die Zugabe von Herz-Gesamt-RNA eine Stimulierung der Translationsaktivität um den Faktor 7.4. Es sei darauf hingewiesen, daß bei der eingesetzten RNA-Menge noch nicht im Sättigungsbereich des Translationssystems gearbeitet wurde: Frühere Versuche hatten gezeigt, daß die Translationsrate in Gegenwart von 67 μg Herz-Gesamt-RNA bis zum 35-fachen Wert gegenüber der endogenen Restaktivität gesteigert werden konnte (VOIT, 1984). Für den eindeutigen qualitativen Nachweis von Hämocyanin erwies sich jedoch die geringe RNA-Menge als ausreichend. Kontrolllexperimente mit Globin-mRNA, dem Hauptsubstrat des Translationssystems der Reticulocyten, führten zur 25-fachen Stimulierung der Translationsrate (500 ng Globin-mRNA: 2.01×10^6 cpm TCA-fällbarer Radioaktivität). Wie Abbildung 1 zeigt, genügte eine Translationsdauer von 90 min, um den Sättigungsbereich der Proteinbiosynthese zu erreichen.

5. Immunologische Analyse der Translationsprodukte

Befand sich nun in der mRNA-Population des Herzgewebes Hämocyanin-mRNA, so sollte dies nach Translation in vitro durch Fällung mit spezifischen Antikörpern gegen Hämocyanin

[^{35}S]-Methionin, cpm $\times 10^{-4}$

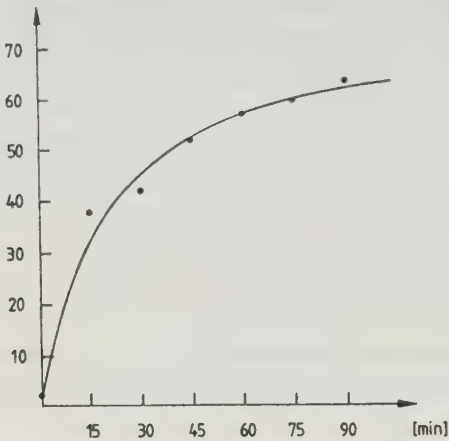


Abb. 1: Zeitabhängiger Einbau von ^{35}S -Methionin in zellfrei-synthetisierte Proteine.

6 μg Herz-Gesamt-RNA aus der Vogelspinne *Eurypelma californicum* wurden 90 min lang mit 10 μl Kaninchenreticulocyten-Lysat, Proteinbiosynthese-Mastermix sowie 30 μCi ^{35}S -Methionin inkubiert.

In 15-minütigen Intervallen wurden Proben des Ansatzes mit TCA gefällt und die inkorporierte Radioaktivität gezählt.

nachgewiesen werden können. Zum immunologischen Nachweis wurde jeweils die Hälfte eines Translationsansatzes mit 40 μl heterologem Antiserum über Nacht in der Kälte zur Immunpräzipitation inkubiert. Zur Immunpräzipitation wurde Protein A zugesetzt (KESSLER, 1981). Protein A ist ein Zelloberflächenbestandteil der meisten *Staphylococcus aureus* Stämme und vermag Immunglobuline, speziell IgGs, in deren F_C -Region stark kovalent zu binden (KESSLER, 1975; 1981; GODING, 1978). Zur indirekten Immunpräzipitation können entweder formalinfixierte *Staphylococcus aureus* Zellen des Stammes COWAN I (Immunopräzipitin von BRL) oder isoliertes und an Sepharose CL-4B gekoppeltes Protein A (PHARMACIA) verwendet werden.

Der Immunpräzipitationsansatz wurde 30 min mit 80 μl in 0.1 M Phosphatpuffer, pH 8.0 aufgeschlammten Protein A-Sepharose Beads inkubiert und danach mehrere Male zur Entfernung unspezifisch adsorbierten Materials mit Phosphatpuffer gewaschen. Nach Abspaltung der Antikörper aus den Antikörper-Protein A-Komplexen mittels 1 M Essigsäure (MacSWEEN and EASTWOOD, 1981) konnten diese durch Zentrifugation von

Protein A-Sepharose abgetrennt werden. Der Antigen-haltige Zentrifugationsüberstand wurde in 8 %igen SDS-Polyacrylamid-Gelen (LAEMMLI, 1970) elektrophoretisch aufgetrennt. Aliquots des Überstandes wurden mit TCA gefällt und auf den quantitativen Gehalt an ^{35}S -Methionin hin überprüft. Die Fluorographie des Gels mit den Immunpräzipitaten zeigte einen deutlichen Einbau von radioaktiven Aminosäuren in Proteine, die im Gel das typische Hämocyanin-Bandenmuster aufwiesen (Abb. 2A): In SDS-Gelen wird authentisches, dissoziiertes 37 S-Hämocyanin wegen der ähnlichen Molekulargewichte der sieben Untereinheiten zwischen 68 kDa und 74 kDa in eine Gruppe von fünf Proteinbanden aufgetrennt. Die Untereinheiten d und f, sowie c und g wandern in diesem Gelsystem gewöhnlich in einer Bande (SCHARTAU et al., 1986). Wie Abb. 2 zeigt, sind authentisches 37 S-Hämocyanin und immunpräzipitierte Translationsprodukte in ihren Proteinbandenmustern identisch.

Der radioaktive Einbau an Methionin in die Translationsprodukte wurde vor und nach der Immunpräzipitation durch Fällung mit TCA bestimmt. Die Daten aus 5 Versuchen zeigten, daß bis zu 10 % der radioaktiven Polypeptidketten mit Antiserum gegen Eurypelma-Hämocyanin und Protein A-Sepharose präzipitiert werden konnten (Tab. 2). Die Fluorographie der Immunpräzipitate in Abb. 2 weist neben dem Hämocyanin lediglich eine intensiv radioaktiv markierte Proteinbande im Größenbereich von 20 kDa auf. Sie sollte bei der Quantifizierung der zellfrei translatierten Hämocyanin-mRNAs mitberücksichtigt werden. Der restliche radioaktive Hintergrund ist vernachlässigbar klein. Bei der Immunpräzipitation mit Hämocyanin-Antiserum und Immunopräzipitin (formalinfixierte *Staphylococcus aureus* Zellen) hatte der Anteil der präzipitierten Proteine 26 % betragen, was allerdings auf die erwähnte hohe, unspezifische Adsorption von "Nicht-Hämocyanin" Molekülen (Abb. 2B) zurückzuführen war (VOIT, 1984).

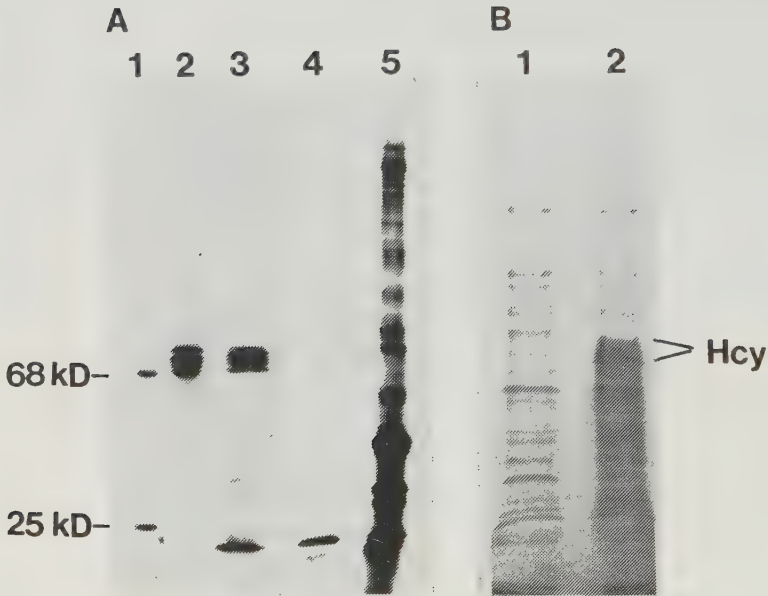


Abb. 2: SDS-PAGE (7.5 %) von in vitro-Translationsprodukten

- A (1) Molekulargewichtsmarker Chymotrypsinogen und Rinderserumalbumin; (2) authentisches dissoziiertes Eurypelma 37 S-Hämocyanin; (3) mit Antiserum gegen dissoziiertes Eurypelma 37 S-Hämocyanin und Protein A-Sepharose immunpräzipitierte in vitro-Translationsprodukte von 6 µg Eurypelma Herz-Gesamt-RNA; (4) infolge endogener Translationsaktivität des Reticulocyten-Lysats synthetisierte Polypeptide; (5) gesamte in vitro-Translationsprodukte von 250 ng Kaninchenreticulocyten-mRNA (Kontrolle).
- B Immunpräzipitation von in vitro-Translationsprodukten mit Antiserum gegen dissoziiertes Eurypelma 37 S-Hämocyanin und Immunopräzipitin zum Vergleich.
- (1) in vitro-Translationsprodukte von 250 ng Kaninchenreticulocyten-mRNA (Kontrolle); (2) in vitro-Translationsprodukte von 7.5 µg Eurypelma Herz-Gesamt-RNA.
- A (1), (2) Färbung mit Coomassie Blau; (3), (4), (5) Fluorogramme.
B (1), (2) Fluorogramme.
Hcy Hämocyanin.

Eingesetzte Menge Gesamt - RNA (μ g)	radioaktiver Einbau von ^{35}S -Methionin (cpm)	immunpräzipitierbare Radioaktivität (cpm)	(%)
6	578130	53180	9.2
"	614220	48500	7.9
"	630180	52730	8.4
"	710460	48020	6.8
"	717000	72460	10.1

Tabelle 2: Radioaktivität (cpm) der gesamten in vitro-Translationsprodukte nach Fällung mit TCA, der mit Antiserum gegen dissoziiertes Eurypelma 37 S-Hämocyanin erhaltenen Immunpräzipitate und deren prozentualer Anteil an den gesamten in vitro-Translationsprodukten.

Es scheint, daß die Hämocyanin-mRNAs für sämtliche Unter-einheiten im zellfreien Proteinbiosynthese-System gleich gut translatiert wurden. Im Gegensatz zum Translationssystem der Xenopus-Oozyten werden im Kaninchenreticulocyten-Lysat die Translationsprodukte nicht weiter posttranslational modifiziert. Darüber, ob in vivo während der Hämocyaninbiosynthese eine derartige posttranslationale Modifikation stattfindet, kann daher mit Ergebnissen, die aus diesem System gewonnen wurden, nichts ausgesagt werden.

II. Erstellung gewebspezifischer cDNA-Genbanken

Nach den Ergebnissen der in vitro-Translationsversuche besitzt das Herzgewebe von *Eurypelma californicum* einen beachtlichen Gehalt an Hämocyanin-mRNA. Aus der qualitativen und quantitativen Auswertung dieser Versuche geht hervor, daß Hämocyanin-mRNA in diesem Gewebe 5-8 % der Gesamt-mRNA repräsentieren dürfte. Somit wären die mRNAs für die 7 verschiedenen Hämocyanin-Untereinheiten jeweils mit einer relativen Häufigkeit von ca. 1 % vertreten. Dies stellt eine sehr günstige Ausgangssituation dar, die gewünschte cDNA in einer cDNA-Genbank aufzufinden. Ungünstigere Faktoren hingegen sind die geringe Verfügbarkeit des mRNA-Templates sowie die zu erwartende Größe des cDNA-Transkripts: Hämocyanin-Untereinheiten bestehen aus ca. 600-650 Aminosäuren. Die codierende Region der zugehörigen mRNA wird demnach ca. 1900 b umfassen, dazu kommen die 5'- und 3'-untranslatierten Bereiche. Lange cDNA-Transkripte sind jedoch in cDNA-Genbanken viel seltener repräsentiert als kurze.

1. Prinzip der Konstruktion von cDNA-Genbanken und Klonierungsstrategie

Die cDNA-Synthese wurde nach der von GUBLER und HOFFMAN (1983) beschriebenen Methode durchgeführt, die gegenüber der früher meist angewandten cDNA-Synthese mit Alkali-Hydrolyse des mRNA-cDNA-Hybrids und Verdauung mit S_1 -Nuklease 10-50-fach effizienter sein soll, gemessen in cDNA-Klonen/ μ g eingesetzter mRNA (GUBLER and HOFFMAN, 1983). Hierbei wird, wie üblich, zur Erststrangsynthese Oligo(dT) als Primer für die Reverse Transkriptase eingesetzt. Im resultierenden mRNA-cDNA-Hybrid wird jedoch die RNA nicht durch alkalische Hydrolyse entfernt, sondern enzymatisch mit RNase H. DNA-Polymerase I kann die von der Ribonuklease geschaffenen Lücken

im mRNA-Strang mit Deoxynukleotiden auffüllen, die noch vorhandenen RNA-Fragmente fungieren hierbei als Oligo-Primer der cDNA-Zweitstrangsynthese. E. coli DNA-Ligase verknüpft schließlich die DNA-Fragmente zum durchgängigen zweiten cDNA-Strang (Abb. 3).

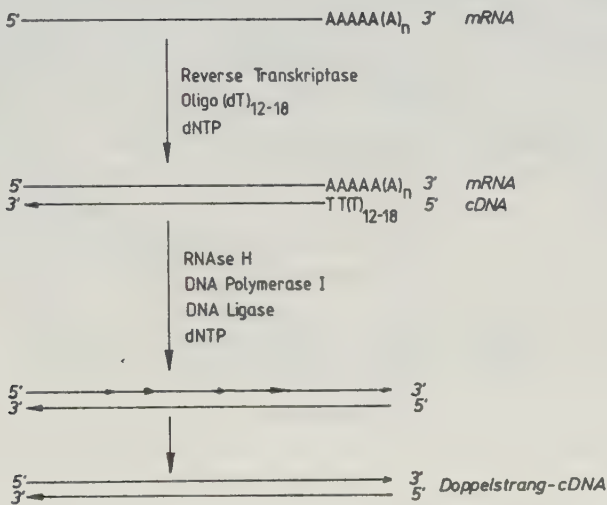


Abb. 3: Prinzip der Synthese doppelsträngiger cDNA nach der Methode von GUBLER und HOFFMAN (1983).

Zur Klonierung der ds-cDNA wurden pUC-Plasmid-Vektoren (VIEIRA and MESSING, 1982; YANISCH-PERRON et al., 1985) und der Vektor pBR322 (BOLIVAR et al., 1977) verwendet. Die cDNA wurde jeweils über dC-dG-Schwänze in die Pst I-Restriktions-schnittstelle der Vektor-DNA inseriert (Abb. 4). Bei dieser Klonierung wird die Pst I-Schnittstelle an beiden Enden des cDNA-Fragments rekonstituiert, die klonierte cDNA kann durch Pst I-Verdau wiedergewonnen werden (OTSUKA, 1981). Wegen der guten thermischen Stabilität von dC-dG-Basenpaarungen genügen bereits kurze dC-dG-Schwänze, um eine Reassoziatio

schen Vektor-DNA und cDNA sicherzustellen. Die Verknüpfung zum durchgängigen rekombinierten Plasmid-DNA-Strang erfolgt in vivo nach Transformation des Empfänger-Bakterienstammes (Abb. 4).

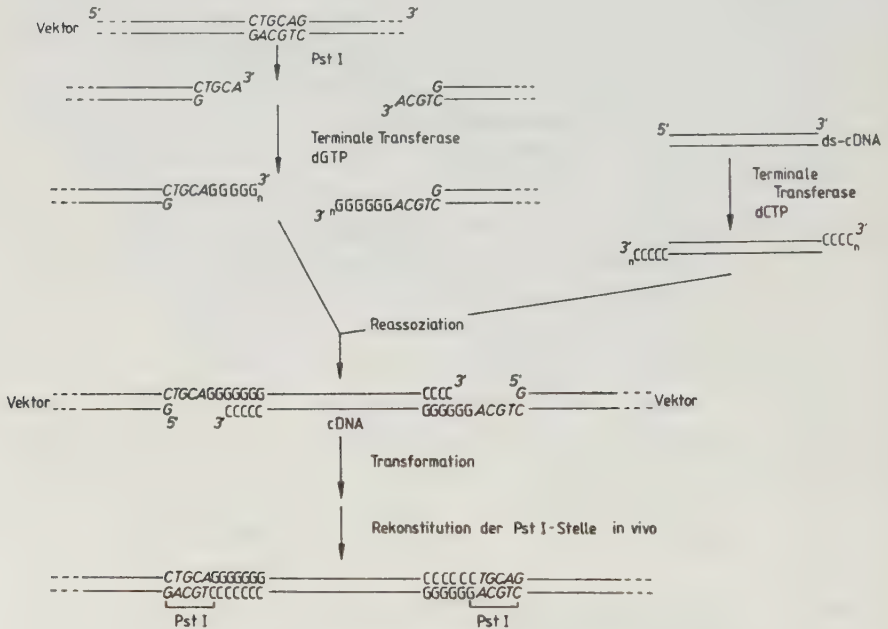


Abb. 4: Prinzip der Klonierung von cDNA über homopolymere (dC)-(dG)-Schwänze in die Pst I-Restriktionsschnittstelle von Vektor-DNA (OTSUKA, 1981).

2. Synthese doppelsträngiger cDNA und Behandlung mit Terminaler Transferase

cDNA-Synthese

Zwischen 21 µg und 40 µg Gesamt-RNA, die aus der Aufarbeitung jeweils eines Vogelspinnenherzens gewonnen wurden, wurden zur Synthese des ersten cDNA-Stranges mit Oligo(dT)

als Primer für die Reverse Transkriptase und mit Deoxynukleotiden in Enzymreaktionspuffer inkubiert. Insgesamt wurden 4 verschiedene cDNA-Genbanken (I-IV) angelegt, die zugehörigen cDNAs erhielten die Bezeichnung cDNA I-IV. Zur Errichtung von Genbank I wurde AMV Reverse Transkriptase von LIFE SCIENCES (St. Petersburg/USA) verwendet, für die übrigen cDNA-Genbanken AMV Reverse Transkriptase der Fa. BOEHRINGER. Durch den Zusatz von 10-20 $\mu\text{Ci } \alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-dCTP}$ zum Reaktionsansatz wurde in einem Teil der Experimente der erste cDNA-Strang radioaktiv markiert. Die Synthese von cDNA III und IV wurde in Parallelansätzen durchgeführt, aber lediglich cDNA III wurde radioaktiv markiert. Über die Messung der mit TCA fällbaren Radioaktivität konnte die Effizienz der Reaktion quantitativ abgeschätzt werden (Tab. 3). Obwohl gleiche Ausgangsmengen an Gesamt-RNA eingesetzt wurden, fiel in den beiden vorgenommenen Messungen die quantitative Ausbeute an ss-cDNA (330 ng; 43 ng) sehr unterschiedlich aus. Dies ist wahrscheinlich auf unterschiedliche Enzymaktivitäten oder Hemmfaktoren im RNA-Isolat zurückzuführen. Allerdings wurde bei den Versuchen der Weg der RNA-Isolierung nicht verändert. Hingegen wurde sowohl in Vorversuchen zur cDNA-Synthese (VOIT, 1984) als auch für cDNA I das Enzym von LIFE SCIENCES eingesetzt, das durchweg höhere radioaktive Einbau-raten in cDNA lieferte. Daß die unterschiedliche Menge an ss-cDNA durch die jeweilige Enzymaktivität verursacht wurde,

	cDNA I	cDNA III
Eingesetzte Menge an Herz-Gesamt-RNA (μg)	38	41
TCA-fällbare Radioaktivität (cpm)	4.4×10^5	5.5×10^4
Molarer Einbau an radioaktivem Nukleotid (pM)	0.1	0.012
Errechnete Menge an Einzelstrang-cDNA (ng)	330	43

Tabelle 3: Quantifizierung der Erststrang-cDNA-Synthese aufgrund des Einbaus an TCA-fällbarer Radioaktivität. Berechnungsgrundlage: gleichmäßige Verteilung der vier Deoxynukleotide.
Eingesetzte Menge $\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-dCTP}$: 10 pM (3000 Ci/mM)
Eingesetzte Menge dCTP : 25 nM
MG Deoxynukleotid : 330

bekräftigt auch die qualitative Analyse der ss-cDNA in Agarosegelen. Nach der Synthese zum ersten cDNA-Strang wurde zunächst durch zweimalige Ammoniumacetatfällung ein Großteil der nicht in DNA eingebauten Radioaktivität aus dem Ansatz entfernt und sodann ein Aliquot der cDNA-Synthese-Produkte (ca. 20000 cpm) in 2 %igen alkalischen Agarosegelen (McDONNELL et al., 1977) elektrophoretisch analysiert. In Abb. 5 sind Autoradiogramme dieser Elektrophoresen dargestellt: Die Einzelstrang-cDNA für Genbank I wanderte in einem Größenbereich von 200 b bis 2700 b. Die Transkripte für Genbank III waren hingegen vornehmlich 200 bis 800 b lang, also durchweg kürzer, was wiederum mit der schwachen radioaktiven Einbaurate korreliert ist. Entsprechend der heterogenen Vielfalt an mRNAs präsentiert sich das cDNA-Syntheseprodukt im Autoradiogramm normalerweise ohne Bandenausbildung. Die distinkte Bande, die im Autoradiogramm von cDNA I im Größenbereich von 1900 b auftaucht, ist ziemlich sicher auf die reverse

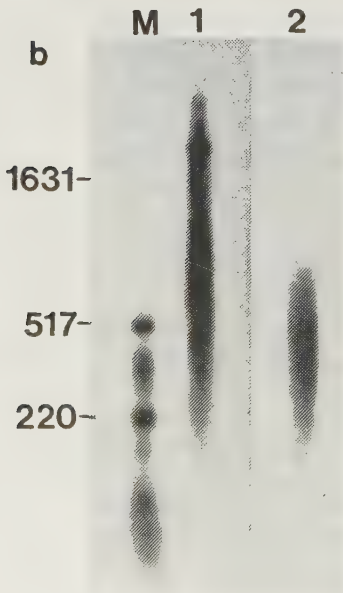


Abb. 5: Autoradiogramme von radioaktiv markierter Einzelstrang-cDNA.

M: pBR322/Hinf I-Restriktionsfragmente, radioaktiv endmarkiert, als Längenstandard.

(1) cDNA I, ca. 20000 cpm.

(2) cDNA III, ca. 20000 cpm.

Die DNA wurde in 2 %igen alkalischen Agarosegelen nach McDONNELL et al. (1977) aufgetrennt.

Transkription der im RNA-Isolat enthaltenen rRNA-Moleküle zurückzuführen: Durch Rückfaltungen im ribosomalen RNA-Strang wird ebenfalls cDNA-Synthese gestartet (Self-Priming) woraus Oligo(dT)-unabhängige Transkriptionsprodukte hervorgehen (HUYNH et al., 1985).

Der mRNA-Gehalt bewegt sich, je nach Zelltyp, zwischen 1 und 5 %. Davon wird jedoch, auch unter optimierten Reaktionsbedingungen, nur ein Teil revers in cDNA transkribiert: Nach HUYNH et al. (1985) werden 5-50 % der Ausgangsmenge an poly(A)⁺-RNA transkribiert, 10-50 % nach WATSON und JACKSON (1985), 10-30 % nach MANIATIS et al. (1982).

Nach Zusatz der Enzyme RNase H, E. coli DNA-Polymerase I und E. coli DNA-Ligase wurde das mRNA-Template im cDNA-mRNA-Hybrid durch einen zweiten, komplementären cDNA-Strang ersetzt (GUBLER and HOFFMAN, 1983). Als Effizienz für die Zweitstrang-Synthese nach der Methode von GUBLER und HOFFMAN werden Ausbeuten von 80-100 % angegeben (WATSON and JACKSON, 1985). In eigenen Versuchen wurde die Ausbeute an resultierendem cDNA-Doppelstrang nicht überprüft. Durch diese Vorgehensweise wird der problematische Verdau mit S₁-Nuklease zum Abbau der Haarnadelschleife zwischen dem 3'-Ende des ersten und dem 5'-Beginn des zweiten cDNA-Stranges umgangen, der stets zur Folge hat, daß Informationen des 3'-Endes des ersten cDNA-Stranges verloren gehen.

Behandlung mit Terminaler Transferase

Eines der gängigsten Verfahren zum Einbau von ds-cDNA in den entsprechenden Vektor stellt die Klonierung in die Pst I Stelle des Vektors über homopolymere poly(dC)-(dG)-Schwänze dar (OTSUKA, 1981). Das Enzym Terminale Deoxynukleotidyl-Transferase addiert Mononukleotide vorzugsweise an überhängende 3'-DNA-Enden (BOLLUM, 1974). In Gegenwart von Co⁺⁺-Ionen werden Deoxynukleotidyl-Schwänze jedoch auch an die 3'-Enden von DNA-Strängen mit glatten und 3'-zurückgesetzten

Enden gefügt (ROYCHOUDHOURY et al., 1976).

Mit Pst I linearisierte und mit dG-"getailte" Vektor-Plasmide pBR322 und pUC9 wurden kommerziell bezogen (BRL; PHARMACIA), pUC19 Plasmid-Vektor wurde selbst präpariert. Die Addition der dG-Reste an die 3'-Enden von 10 µg linearisierter pUC19-DNA mit Terminaler Transferase erfolgte nach den Vorschriften des Enzymherstellers und ROYCHOUDHOURY und WU (1980) wie im Methodenteil beschrieben. Analog wurden an doppelsträngige cDNA poly(C)-Schwänze addiert. Nach BRUTLAG et al. (1977) wird jedoch Doppelstrang-DNA mit glatten und 3'-zurückgesetzten Enden, trotz Gegenwart von Co^{++} -Ionen, nur mit einer Effizienz von 40 % "getailt".

Für Klonierungszwecke sollten sich aus Stabilitätsgründen an den Enden der rekombinierenden DNA-Moleküle homopolymere Schwänze aus 10-25 dG- bzw. dC-Resten befinden (DENG and WU, 1981). Durch Zugabe von radioaktivem ^3H -dNTP zur "Tailing"-Reaktion kann die Länge des addierten Polymers berechnet werden (MANIATIS et al., 1982). Für die Hämocyanin-cDNA ermittelte ich nach Säurefällung und Radioaktivitätszählung, daß durchschnittlich 9 dC-Reste an die 3'-Enden addiert worden waren. Als durchschnittliche Moleküllänge wurden 900 bp angenommen (cDNA I; Abb. 5). Die Bestimmung der Polymerlänge wurde nur bei cDNA I durchgeführt. Da in diese Berechnung das Molekulargewicht der Substrat-DNA eingeht, kann die Effizienz der Reaktion für die homogene Vektor-DNA recht gut überprüft werden, ist aber fehlerbehaftet für die in ihren Molekulargewichten sehr heterogene cDNA-Population.

3. cDNA-Klonierungen, Klonierungseffizienzen und Background der Genbanken

GUBLER und HOFFMAN (1983) erhielten optimale Transformationseffizienzen bei einem 50-fachen Gewichtsüberschuß von Vektor-DNA (pBR322) gegenüber cDNA, nach MANIATIS et al. (1982) sollten Vektor-DNA und cDNA äquimolar im Reassozi-

tionsansatz vorliegen. In den Annealing-Ansätzen wurde stets Vektor-DNA im Überschuß gegenüber cDNA eingesetzt, außer bei Genbank I. Die Vektor-DNA-Konzentration im Reaktionsansatz betrug 1 ng/ μ l. Angaben über den für die jeweilige Genbank verwendeten Plasmid-Vektor sowie die eingesetzte Menge an Vektor-DNA finden sich in Tabelle 5.

Klonierungseffizienzen und Background der Genbanken

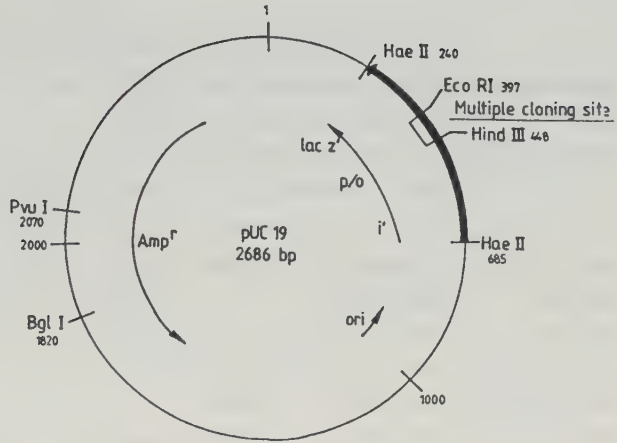
Jeweils 100 μ l kompetenzinduzierter *E. coli* Zellen wurden mit 10 μ l Annealing-Ansatz transformiert. Als Empfängerzellen dienten die *E. coli* Stämme DH1 (HANAHAH, 1983) und DH5 α (BRL, 1986), Beide Stämme sind Rekombinationsdefektmutanten (*recA1*). Der Stamm DH5 ist ein Derivat des Stammes DH1, jedoch mit höherer Transformationseffizienz (HANAHAH, 1985). Im Stamm DH5 α ist der Genotyp der DH5-Zellen durch das Genstück ϕ 80dlacZ Δ M15 erweitert, was diesen Zelltyp, im Zusammenwirken mit dem lac-Gen-Anteil der pUC- und M13-Vektoren zur α -Komplementation der β -Galaktosidase (LANGLEY et al., 1975) befähigt. Die hohe Transformationseffizienz des Elternstammes blieb erhalten. Diese wird mit maximal $1-5 \times 10^8$ Transformanten/ μ g pUC19-DNA angegeben (BRL, 1986). Für die Transformation wurden Zellen verwendet, deren Kompetenz nach einem Protokoll von V. SIMANIS (HANAHAH, 1985) induziert worden war. Nach dieser Prozedur sollen Transformationseffizienzen von 10^7-10^8 transformierten Zellen/ μ g Vektor-DNA erreicht werden. Die verwendeten Zellen waren, soweit nicht anders angegeben, bei -70 °C eingefroren und nicht älter als 2 Wochen. Testtransformationen mit Supercóil-Plasmid-DNA, die über Cäsiumchloridgradienten gereinigt war, hatten Transformationsraten zwischen 8.7×10^6 und 4.8×10^7 Transformanten/ μ g pUC-Plasmid-DNA ergeben. Bei allen Transformationen mit cDNA wurden zunächst 5 % des Transformationsansatzes auf Agarmedium ausplattiert und damit die zu erwartende Koloniedichte bestimmt. Da diese bei den Genbanken I-III sehr niedrig war, wurden hier die cDNA-Transformanten

direkt auf Agarmedium mit den entsprechenden Selektionsmarkern ausplattiert.

Genbank I: Genbank I, in pUC9 (Abb. 6) erstellt, umfaßte lediglich 2200 Ampicillin-resistente Kolonien. Das pUC-Vektor-System an sich gibt noch keine Auskunft über den Anteil nicht-rekombinanter Klone. Aus umfangreichen minipräparativen Plasmidisolierungen ging hervor, daß 45 % der Klone keine oder nur sehr kleine (<100 bp) Fremd-DNA-Fragmente in das Plasmid eingebaut hatten.

Genbank II: Genbank II wurde in pBR322-Plasmiden (Abb. 7) erstellt. Da cDNA II nicht radioaktiv markiert wurde, können keine Angaben über die cDNA-Ausbeute gemacht werden. Zum Annealing wurde die doppelte Vektormenge wie für Genbank I eingesetzt. Klonierung in pBR-Vektoren erweist sich insofern als vorteilhaft, als zwischen "echten" und "unechten" Rekombinanten unterschieden werden kann: Durch Insertion der cDNA in die Pst I-Stelle des Vektors wird das β -Lactamase-Gen geteilt und inaktiviert. cDNA-enthaltende Klone sind Tetracyclin-resistent und Ampicillin-sensitiv. Es wurden ca. 6200 Tetracyclin-resistente Kolonien erhalten, 20 % von diesen waren zusätzlich Ampicillin-resistent.

Genbanken III und IV: Zur Etablierung der Genbanken III und IV wurden pUC19-Vektoren (Abb. 6) in Kombination mit den neu entwickelten DH5 α -Zellen verwendet, wodurch wiederum rekombinierte Plasmid-DNA enthaltende Klone von Nichtrekombinanten unterschieden werden können: pUC-Vektoren enthalten neben DNA-Teilen von pBR322 einen Teil des lac-Gens von E. coli, in den eine Polylinkerregion (Multiple-cloning-site) inseriert ist. DH5 α -Zellen beherbergen, wie vorher erwähnt, das zur α -Komplementation benötigte lac-Z-Genfragment $\phi 80\text{dlacZAM15}$. Die Aufnahme von reinen pUC-Plasmiden führt daher zur Resistenz gegenüber Ampicillin und zur β -Galaktosidase-Aktivität. Rekombinierte pUC-Plasmide bewahren zwar



Multiple cloning site des Vektor pUC19:

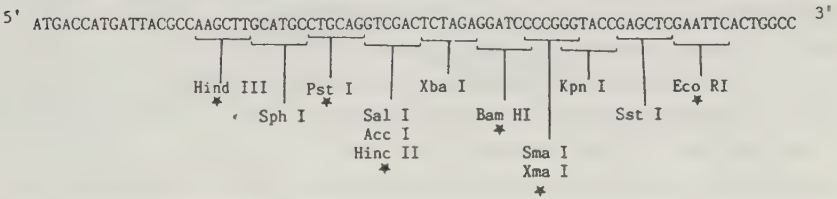


Abb. 6: Genetische Karte und Polyklonierungsregion des Plasmid-Vektors pUC19. Restriktionsschnittstellen der MCS, die im Vektor pUC 9 enthalten sind, sind mit ★ gekennzeichnet (YANISCH-PERRON et al., 1985).

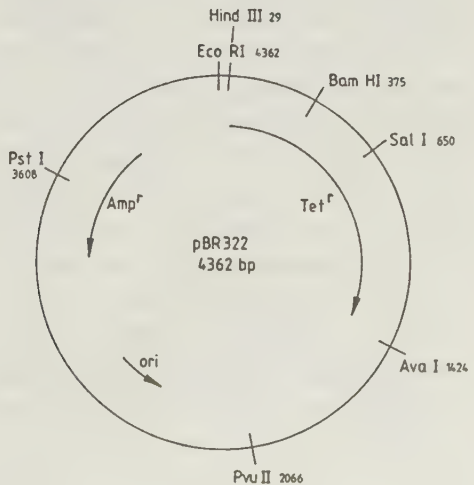


Abb. 7: Genetische Karte des Klonierungsvektors pBR322 (BOLIVAR et al., 1977).

die Ampicillinresistenz, durch die cDNA-Insertion in die MCS geht jedoch die β -Galaktosidase-Aktivität verloren. β -Galaktosidase-aktive Zellen hydrolysieren das Chromogen X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galaktopyranosid) zu dem blauen Farbstoff 5-Brom-4-Chlor-Indigo und Galaktose und sind daher an der Blaufärbung ihrer Kolonien erkennbar. Zellen, die rekombinierte Plasmide enthalten, bleiben ungefärbt. Zur α -Komplementation in Verbindung mit pUC-Vektoren eignet sich auch der Bakterienstamm E. coli JM109, der im Gegensatz zu älteren Zellstämmen der JM-Serie die für stabile cDNA-Klonierungen wichtige recA1 Mutation trägt (YANISCH-PERRON et al., 1985).

Transformation mit cDNA III in pUC19-Plasmiden ergab auf Ampicillin- und X-Gal-haltigem Agarmedium ca. 3400 Klone. Nur 4 % der Kolonien waren blau gefärbt. Wie die minipräparative Plasmidanalyse zeigte, hatten jedoch auch die Zellen blau gefärbter Kolonien teilweise sehr kleine cDNA-Fragmente (100-150 bp) in das Plasmid integriert. Kleine Fremd-DNA-Fragmente, die nicht den Leserahmen der Aminosäuresequenz zerstören, werden für die α -Komplementation der β -Galaktosidase oftmals toleriert.

cDNA-Genbank IV wurde direkt auf Nitrocellulosefilter ausplattiert (HANAHAH and MESELSON, 1980). Die Filter wurden alphabetisch von A bis W gekennzeichnet. Pro Filter wurden zwischen ca. 1000 und 1800 Klone verteilt. Genbank IV enthält ca. 27000 Klone, der Hintergrund an nichtrekombinanten Zellen, errechnet nach der Anzahl blauer Kolonien, beträgt ca. 5 %. Daß die Genbank IV so sehr reichhaltiger ist als die parallel dazu erstellte Genbank III kann damit erklärt werden, daß für die Transformation der cDNA IV-Plasmide frisch hergestellte kompetente Bakterienzellen verwendet wurden. Generell hatten die cDNA-Genbanken in Vektor pUC19 den geringsten Anteil an Kolonien mit nicht-rekombinierter Plasmid-DNA. Die Tabelle 5 zeigt eine Zusammenfassung von verwendeten Vektoren, Bakterienstämmen und Klonierungsausbeuten.

	cDNA I	cDNA II	cDNA III	cDNA IV
Plasmid-Vektor	pUC9	pBR322	pUC19	pUC19
Klonierungsstelle	Pst I	Pst I	Pst I	Pst I
Eingesetzte Menge an Vektor-DNA (ng)	90	300	900	900
E. coli Empfängerstamm	DH1	DH1	DH5 α	DH5 α
Selektionsmarker für rekombinante Klone	Ampicillin-resistenz	Tetracyclin-resistenz	Ampicillinresistenz, keine β -Galaktosidase-Aktivität	
Selektionsmarker für nichtrekombinante Klone	Ampicillin-resistenz	Tetracyclin-resistenz + Ampicillin-resistenz	Ampicillinresistenz + β -Galaktosidase-Aktivität	
Erhaltene Gesamt-Anzahl an Klonen	2200	6200	3400	27000
Anteil nichtrekombinanter Klone (%)	45	20	4	5

Tabelle 5: Aufstellung über die zur cDNA-Klonierung verwendeten Plasmid-Vektoren und Bakterienstämme, sowie über Klonierungseffizienzen und Background der Genbanken.

III. Isolierung und Charakterisierung eines Hämocyanin-cDNA-Klons aus Genbank I

1. Strategie zum Auffinden von Hämocyanin-cDNA-Klonen

Zur Hybridisierung mit klonierter DNA eignet sich prinzipiell jede Art von Nukleinsäure. Sind bereits Aminosäuresequenzen des klonierten Genprodukts bekannt, so bietet sich vorzugsweise ein synthetisches Oligonukleotid als Hybridisierungsprobe an.

Zu Beginn der Arbeit lagen die kompletten Aminosäuresequenzen der Untereinheiten d und e des Vogelspinnenhämocyanins vor (SCHARTAU et al., 1983; SCHNEIDER et al., 1983), sowie Teilsequenzen folgender Arthropodenhämocyanine: Eurypelma californicum (UE a), Limulus polyphemus (UE IIIb, II), Tachyplesus tridentatus (UE α), Panulirus interruptus (UE a). Ein Sequenzvergleich dieser untereinander verwandten Polypeptidketten zeigte im Bereich des "Kupfer A"-Sauerstoffbindungsbereichs die extrem konservierte Aminosäurefolge -HISTIDIN-HISTIDIN-TRYPTOPHAN-HISTIDIN-TRYPTOPHAN-HISTIDIN - (SCHNEIDER et al., 1982; LINZEN et al., 1985) (Abb. 8). Dieses Peptid eignet sich in mehrfacher Hinsicht zur Übersetzung in ein Oligonukleotid:

- Aufgrund der funktionellen Bedeutung dieses Proteinbereichs ist es wahrscheinlich, daß auch die bislang unbekannten Untereinheiten diese Sequenz konserviert haben.
- Der genetische Code der Aminosäuren Histidin und Tryptophan ist nur gering bzw. gar nicht degeneriert.
- Unter Weglassung der dritten Base des carboxyterminalen Histidins ergibt sich daher ein 17-meres Oligonukleotidgemisch aus nur 8 verschiedenen Sequenzen (Abb. 8).

Als ideale Oligonukleotidlänge zum Screening von cDNA-Genbanken gelten 17 Basen (MASON and WILLIAMS, 1985). Kürzere

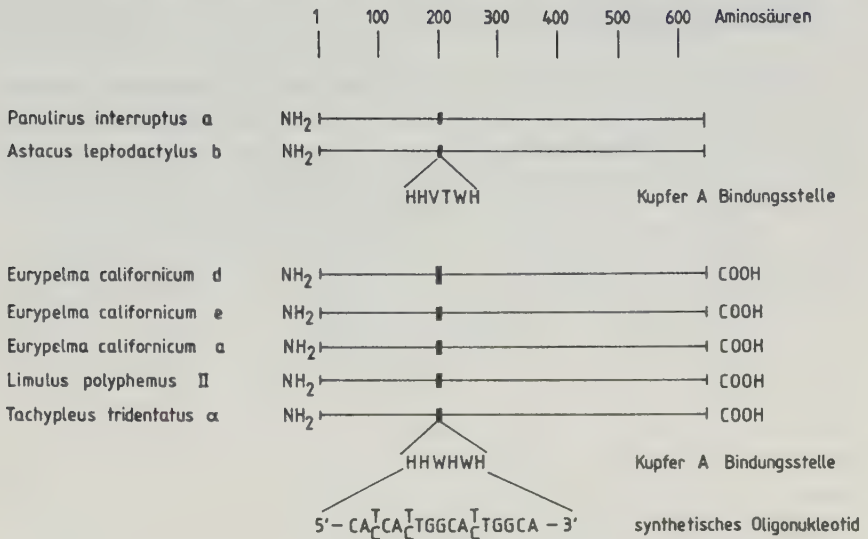


Abb. 8: Synthetische 17-mer "Kupfer A"-Oligonukleotidprobe.

Die Oligonukleotidsequenz entspricht der stark konservierten Aminosäuresequenz His-His-Trp-His-Trp-His im "Kupfer A"-Sauerstoffbindungs-bereich, die bei allen bislang untersuchten Cheliceraten-Hämocyanin-Untereinheiten identisch ist. Zur Abdeckung der Codonvariabilität genügen 8 unterschiedliche Oligonukleotide.

Oligomere sind für das Screening in großen Genomen nicht so hinreichend spezifisch, längere Oligomere sind hinsichtlich der zunehmenden Heterogenität des Probengemisches ungünstiger. Die synthetische Oligonukleotidprobe wurde von Herrn T. Dörper (Abt. Prof. Winnacker) hergestellt.

2. Screening der cDNA-Klone der Genbank I mit "Kupfer A"- Oligonukleotidprobe

Rekombinante Klone, die Hämocyanin-cDNA eingebaut haben, lassen sich an der Hybridisierung mit der spezifischen "Kupfer A"-Oligonukleotidprobe erkennen. Insgesamt 1000 Klone der Genbank, die ursprünglich auf Agarmediumplatten ausplattiert worden waren, wurden auf frische Medienplatten im Rastermuster umgesetzt, kultiviert und anschließend auf Nitrocellulosefilter transferiert und wiederum kultiviert. Lysis und Denaturierung von Bakterienzellen und DNA auf den Filtern wurde bei Genbank I noch anders durchgeführt als beim Screening der Genbanken II-IV, das im Methodenteil beschrieben ist. Im Falle von Genbank I wurden die Filter nach MANIATIS et al. (1982) zur Denaturierung 2 x 5 min mit 0.5 M NaOH behandelt und sodann je 1 x 5 min sukzessive mit 1 M Tris-HCl, pH 7.4 und 1 M Tris-HCl, pH 7.4/1.5 M NaCl neutralisiert. Die übrigen Prozeduren zur DNA-Fixierung wurden wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt. Zur Hybridisierung mit dem "Kupfer A"-Oligonukleotidgemisch wurde über Nacht zwischen 35 °C und 45 °C inkubiert (Tabelle 6). Nach SZOSTAK et al. (1979) sollte die Hybridisierungstemperatur 20 °C unter der Schmelztemperatur T_D des Oligonukleotides liegen. Die Schmelztemperatur T_D ist als derjenige Temperaturwert definiert, bei dem perfekt zusammengelagerte Hybride zur Hälfte dissoziieren. Nach MASON and WILLIAMS (1985) wird lediglich 5 °C unter dem errechneten T_D hybridisiert. Die Waschtemperatur ist identisch mit dem T_D -Wert und berechnet sich aus der Summe der Basen der Oligonukleotidprobe: Für jedes A/T-Paar werden 2 °C Waschtemperatur veranschlagt, für jedes G/C-Paar 4 °C. Da die "Kupfer A"-Oligonukleotidprobe heterogen ist, ergibt sich eine minimale (T_{Dmin}) und eine maximale Waschtemperatur (T_{Dmax}) (Tab. 6).

Beim Kolonien-Screening von 1000 cDNA-Klonen mit der "Kupfer A"-Oligonukleotidprobe konnte kein eindeutig positiver Klon identifiziert werden. Die Filter waren jeweils bei

Zusammensetzung des gemischten Oligonukleotids: 5' CA _T CA _T TGGCA _T TGGCA 3'		
Minimale Anzahl an G/C-Resten:	8	T _{Dmin} = 50 °C
Maximale Anzahl an A/T-Resten:	9	
Maximale Anzahl an G/C-Resten:	11	T _{Dmax} = 56 °C
Minimale Anzahl an A/T-Resten:	6	

Gewählte Hybridisierungstemperaturen:

nach SZOSTAK et al. (1979):	T = 35 °C
nach MASON und WILLIAMS (1985):	T = 45 °C

Tabelle 6: "Kupfer A"-Oligonukleotidprobe.
Hybridisierungs- und Waschttemperaturen.

T_{Dmin} 50 °C in 6 x SSC, 0.1 % SDS gewaschen worden. Um zunächst einen Überblick über die Längen der inserierten cDNAs zu bekommen, wurden minipräparative Plasmidanalysen (HOLMES and QUIGLEY, 1981) in großem Umfang durchgeführt. Zur Längenbestimmung wurden die isolierten, rekombinierten Plasmid-cDNAs in 1.2 %igen Agarosegelen analysiert. Bei dieser Analyse wurden 19 Klone entdeckt, die cDNAs einer Größe von 1200 bp und länger eingebaut hatten. Die Plasmid-DNA dieser 19 Klone wurde nach Elektrophorese und Denaturierung auf Nitrocellulosepapier transferiert. Southern Blots dieser transferierten DNAs enthüllten eine cDNA, die stark mit der "Kupfer A"-Oligonukleotidprobe hybridisierte. Die Plasmid-cDNA/Oligonukleotid-Hybride waren noch bei 55 °C stabil (Abb. 9). Alle übrigen cDNA-Klone der Genbank I ergaben keine positiven Hybridisierungssignale mit dem Oligonukleotid.

3. Restriktionskartierung des Klons pHc4

Um die Länge der inserierten cDNA des Klons pHc4 zu bestimmen, wurde die klonierte DNA durch Restriktion mit Pst I wieder aus der Klonierungsstelle des Vektors herausgeschnitten und die DNA-Fragmente in 1.5 %igen Agarosegelen aufge-

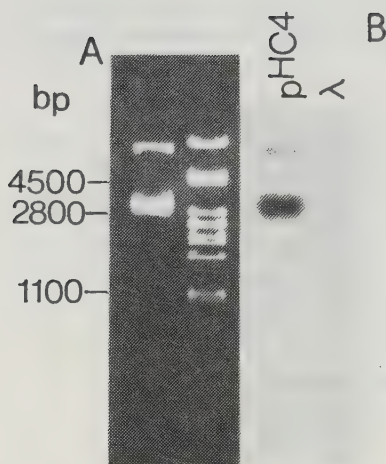


Abb. 9: Agarosegelelektrophorese (1.2 % Agarose) von cDNA pHC4 in Vektor pUC9.

(A) Agarosegel, mit Ethidiumbromid gefärbt; untere Bande: Supercoil-Plasmid; obere Bande: Open-circle-Plasmid. Marker (rechter Streifen) λ -DNA, geschnitten mit Pst I.

(B) Autoradiographie des Southern Blots nach Transfer der DNA und Hybridisierung mit γ - ^{32}P -markiertem "Kupfer A"-Oligonukleotid. Hybridisierungstemperatur: 42 °C Waschen: 4 min, 55 °C in 6 x SSC, 0.1 % SDS.

trennt. Neben dem ca. 2700 bp langen, linearisierten Vektor pUC9 wurden zwei weitere DNA-Fragmente erhalten: Eine interne Pst I-Schnittstelle teilt die 1650 bp lange cDNA in ein 1400 bp Fragment sowie ein 250 bp Fragment (Abb. 10). Auf der Suche nach weiteren Restriktionsschnittstellen wurden zunächst verschiedene Restriktionsenzyme verwendet, die Hexanukleotidsequenzen erkennen: Bam HI, Hind III, Eco RI, Sal I, Kpn I und Sma I. Unter diesen Enzymen führten Bam HI und Hind III zu Restriktionsschnitten in der cDNA. Durch Hind III-Verdau wird ein 700 bp langes cDNA-Fragment freigesetzt, durch Bam HI-Verdau ein cDNA-Fragment von ca. 1300 bp (Abb. 10). Die Enzyme Sal I, Eco RI (Abb. 11) und Sma I führten lediglich zu einer Linearisierung des rekombinanten Plasmids über die Erkennungsstellen dieser Enzyme in der Polyklonierungsregion von pUC9, ebenso wenig fand sich eine Restriktionsstelle für Kpn I. Es stellte sich jedoch heraus, daß alleine Doppelrestriktionen mit den Enzymen Bam HI, Hind III und Pst I genühten, um ausreichend kurze Fragmente zur Subklonierung für die anschließende Sequenzierung zu er-

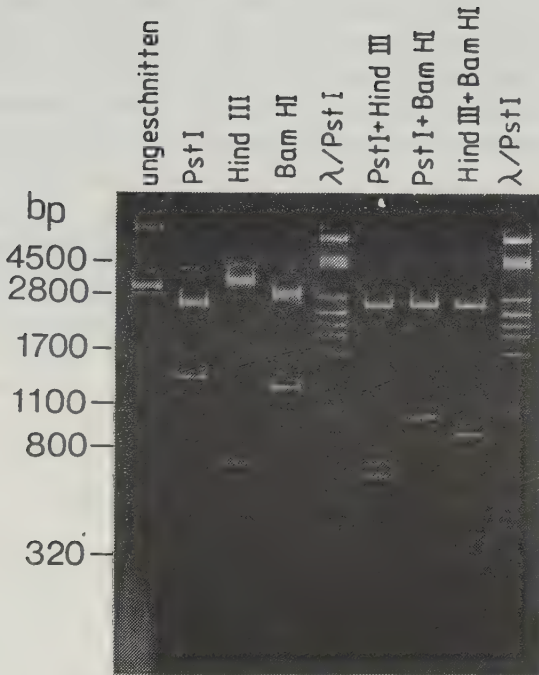


Abb. 10: Restriktionsanalyse von pHC4 DNA.

pHC4 DNA aus minipräparativer Alkali-Plasmid-Isolierung wurde mit den Enzymen Pst I, Hind III und Bam HI restringiert. Bei Doppel-Restriktionen wurde nacheinander in der angegebenen Reihenfolge geschnitten. Die Restriktionsfragmente wurden in 1.5 %igen Agarosegelen aufgetrennt. Die folgenden Fragmentlängen wurden ermittelt:

Pst I: 250 bp / 1400 bp / 2700 bp (pUC)
Hind III: 700 bp / 3650 bp (cDNA + pUC)
Bam HI: 1300 bp / 3050 bp (cDNA + pUC)
Pst I + Hind III: 250 bp / 680 bp / 700 bp / 2700 bp (pUC)
Pst I + Bam HI: 250 bp / 320 bp / 1080 bp / 2700 bp (pUC)
Hind III + Bam HI: 320 bp / 380 bp / 950 bp / 2700 bp (pUC)

Marker: λ-DNA/Pst I

halten (Abb. 10). Um die Orientierung der cDNA im Vektor und die Lage der Restriktionsfragmente zueinander zu ermitteln, wurde erneut die "Kupfer A"-Oligonukleotidprobe verwendet.

Fragmente aus der Restriktion von Plasmid-DNA wurden in 1.5 %igen Agarosegelen elektrophoretisch getrennt, denaturiert und auf Nitrocellulosepapier transferiert (SOUTHERN, 1975). Die Southern Blots wurden mit der radioaktiv markierten "Kupfer A"-Oligonukleotidprobe hybridisiert. Abb. 11 zeigt die Autoradiographie eines hybridisierten Filters neben dem zugehörigen, mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegel nach verschiedenen Spaltungen von pH4 Plasmid-cDNA vor dem Transfer. Fragmente, die den codierenden Abschnitt für die "Kupfer A"-Sauerstoffbindungsregion enthalten, sind radioaktiv markiert. Die Länge der Restriktionsfragmente, deren Anordnung und Hybridisierung mit dem "Kupfer A"-Oligonukleotid sind in Abb. 12 zusammengefaßt.

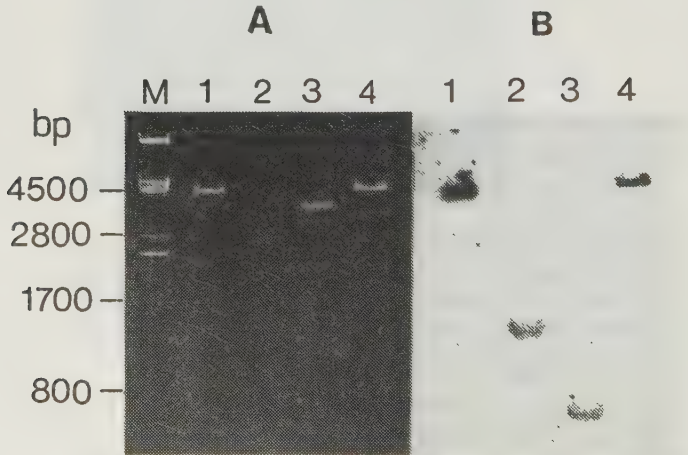


Abb. 11: Southern Blot von Restriktionen des Klon's pH4.

Die Plasmid-DNA des Klon's pH4 wurde mit den Restriktionsenzymen Sal I (Spur 1), Pst I (Spur 2), Hind III (Spur 3) und Eco RI (Spur 4) geschnitten und die Fragmente in 1.5 %igem Agarosegel getrennt.

(A) DNA gefärbt mit Ethidiumbromid. Als Längenstandard dienten λ -DNA/Pst I Restriktionsfragmente (Spur M).

(B) Die Fragmente wurden auf Nitrocellulosepapier übertragen und mit γ -³²P-markierten "Kupfer A"-Oligonukleotiden hybridisiert.

Hybridisierungstemperatur: 35 °C

Waschen: 50 °C, 5 min in 6 x SSC, 0.1 % SDS.

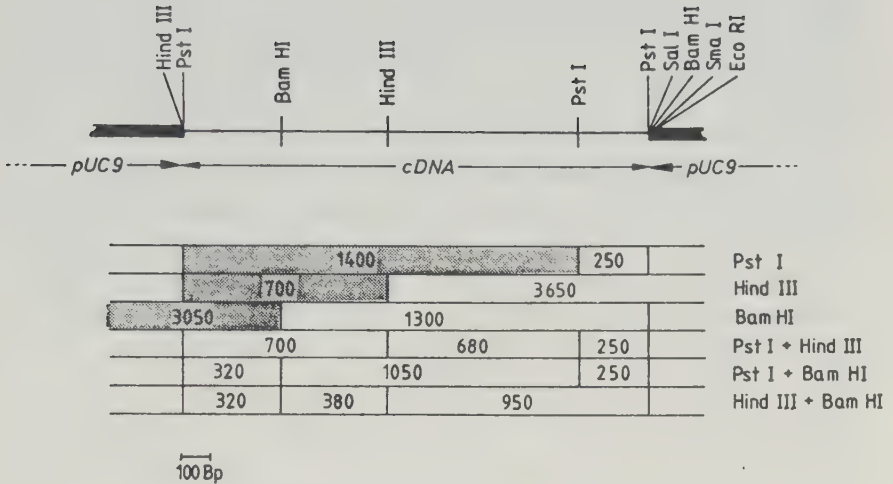


Abb. 12: Restriktionskarte der cDNA des Klons pHC4.

Restriktionsfragmente, die mit dem "Kupfer A"-Oligonukleotid hybridisierten, sind schattiert.

4. Subklonierung der cDNA des Klons pHC4 in M13-DNA

Nachdem die cDNA des Klons pHC4 durch "Kupfer A"-Oligonukleotid-Hybridisierungen als Hämocyanin-cDNA charakterisiert worden war, mußte dies aufgrund der DNA-Sequenz bestätigt werden. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurden DNA-Sequenzierungen von klonierter DNA nach der Dideoxy-Methode (SANGER et al., 1977) in den meisten Fällen im M13-Sequenzierungssystem (MESSING et al., 1977) durchgeführt. Die direkte enzymatische Sequenzierung von klonierter DNA im Plasmid ohne vorherige Umklonierung auf der Basis der Dideoxy-Methode war noch nicht weit verbreitet (WALLACE et al., 1981). So wurde auch die cDNA des Klons pHC4 - im Gegensatz zu später bearbeiteten cDNA-Klonen - in die nicht-lytischen, filamentösen M13-Phagen umkloniert und in diesen sequenziert.

Zur Konstruktion der Subklone in M13-DNA wurden die je

einmal in der cDNA auftretenden Restriktionsstellen von Bam HI, Pst I und Hind III verwendet (Abb. 10 und 12). Die Länge der bei der Spaltung mit diesen Enzymen erzeugten DNA-Fragmente ist in einem Größenbereich, der, zumindest von beiden DNA-Enden her, überlappend zu sequenzieren ist. Als Vektoren wurden M13mp8, mp9, mp10 und mp11 verwendet. Restriktion mit Pst I lieferte ein 250 bp langes cDNA-Fragment, das in die Pst I-Stelle von M13mp10 kloniert wurde. Nach Doppelrestriktion der cDNA mit Bam HI und Hind III wurde das 320 bp lange Fragment isoliert und in die Hind III/Bam HI-Stelle des Vektors M13mp11 in umgekehrter Orientierung kloniert. Das zweite, kleine cDNA-Fragment (380 bp) aus dieser Spaltung wurde, in unterschiedlicher Orientierung, in die entsprechenden Restriktionsstellen von M13mp8 und mp11 eingebaut. Übrig blieb ein etwa 600 bp langes Fragment mit Hind III bzw. Pst I-Restriktionsschnittenden. Da auf Anhieb keine Restriktionsstelle gefunden wurde, die dieses Fragment halbierte, wurde es, wiederum in unterschiedlicher Orientierung, um eine Sequenzierung von beiden Enden des DNA-Fragments zu ermöglichen, in die Hind III/Pst I-Stellen der Vektoren M13mp8 und mp9 unterkloniert. Die im M13-Phagen etablierten Subklone sind in Tabelle 7 zusammengefaßt.

Zur Transfektion der rekombinierten Phagen-DNA dienten

cDNA-Fragment	Restriktions- enden	Länge	M13-Vektor
HC4PB320	Pst I/Bam HI	ca. 320 bp	mp11/Pst I + Bam HI
HC4PP240	Pst I/Pst I	ca. 250 bp	mp10/Pst I
HC4BH380	Bam HI/Hind III	ca. 380 bp	mp8/Bam HI + Hind III
"	" / "	"	mp11/Bam HI + Hind III
HC4HP660	Hind III/Pst I	ca. 680 bp	mp8/Hind III + Pst I
"	" / "	"	mp9/Hind III + Pst I

Tabelle 7: Klonierung von Fragmenten des cDNA-Klons pH4 in M13-Vektoren.

E. coli Zellen des Stammes JM103. Die Transfektionsrate war jeweils hoch genug, daß zur Kompetenzinduktion der Zellen die einfache Calciumchlorid-Methode nach MANDEL und HIGA (1970) ausreichte. Durch Insertion der Fremd-DNA in die mit den pUC-Plasmidvektoren identischen Polyklonierungsstellen der M13-DNA (MESSING, 1983) wird wiederum die β -Galaktosidaseaktivität zerstört. Das zur α -Komplementation benötigte lacZ-Genfragment wurde hierbei von den Wirtszellen der E. coli JM-Reihe gestellt. Das Fehlen oder Vorhandensein der β -Galaktosidaseaktivität dient auch hier als Selektionsmarker zur Unterscheidung rekombinanter und nichtrekombinanter Phagen. Die Plaques von M13-Phagen sind stets trübe, da die Ausschleusung der fertigen Phagen aus den Bakterienzellen keine Lysis, sondern lediglich eine Wachstumsverminderung der Wirtszellen hervorruft (MESSING, 1983). Routinemäßig ergab ein Transfektionsansatz, wie er im Methodenteil beschrieben ist, je nach klonierter Insert-DNA, zwischen 200 und 1000 weißer Plaques. Der Hintergrund an nichtrekombinanten Phagen betrug ca. 3-5 %. Die Fremd-DNA-Fragmente waren in allen Fällen stabil in die M13-DNA integriert worden.

5. Sequenzanalyse der cDNA des Klons pHc4

Zur Sequenzanalyse von DNA stehen grundsätzlich zwei Methoden zur Wahl: Die chemische Sequenzierung nach MAXAM und GILBERT (1977) und die enzymatische Sequenzierung (SANGER et al., 1977), diese meist in Kombination mit dem M13-Klonierungs-/Sequenzierungssystem (MESSING, 1983). Ich wählte in meiner Arbeit ausschließlich die enzymatische DNA-Sequenzierung an. Das Prinzip dieser Sequenzierung beruht auf der enzymatischen Synthese eines komplementären DNA-Stranges an einer einzelsträngigen DNA als Template in Gegenwart eines kurzen, synthetischen Primers, der kurz vor/hinter der Insertionsstelle der Fremd-DNA an einen DNA-Abschnitt des Vektors bindet. In vier parallelen Reaktionsansätzen wird die

DNA-Synthese am 3'-Ende des Primers gestartet und durch Zusatz je eines basenspezifischen Dideoxynukleotids pro Reaktionsansatz zu der für die DNA-Synthese notwendigen Deoxynukleotidmischung, basenspezifisch abgebrochen (Kettenabbruchverfahren). Ob die Kettenabbrüche gleichmäßig über die gesamte DNA-Sequenz erfolgen, hängt vom molaren Verhältnis von dNTP/ddNTP ab.

Für alle Sequenzreaktionen an M13-Einzelstrang-Matrize wurde ein 17-mer Sequenzprimer (BIOLABS) verwendet. Dieser Universalprimer ist komplementär zu einer Nukleotidsequenz am 3'-Ende des M13-(+)Stranges (Abb. 13). Die Sequenzreaktion wurde, wie im Methodenteil beschrieben, durchgeführt. 1/4 des sequenzierten Probenmaterials wurde nach Reaktionsende denaturiert und in ultradünnen Harnstoff/Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt. Mit Hilfe von Geldickegradienten konnte der Bandenauflösungsbereich pro Elektrophoreselauf wesentlich erhöht werden. Meist genügten zwei bis drei Elektrophoreseläufe, um DNA-Sequenzen bis zu 400 Basen eindeutig identifizieren zu können: Der erste Lauf wurde jeweils beendet, sobald der Bromphenolblau-Marker etwa 3 cm vom unteren Gelrand entfernt war. Bromphenolblau wandert in 6 %igen, denaturierenden Polyacrylamidgelen zusammen mit 26 b langen DNA-Fragmenten (MANIATIS et al., 1982). In der zweiten und dritten Gelanalyse wurde die Elektrophorese gestoppt, nachdem der Marker Xylencyanol am unteren Gelrand angelangt war, bzw. 30-45 min danach. Xylencyanol wandert im verwendeten Gelsystem gleichschnell wie DNA-Stücke von einer Länge von 106 b.

In Abb. 14 sind die Sequenzierrichtung und die Länge der im Gel jeweils lesbaren Sequenzbereiche dargestellt. Das Fragment HC4PP240 wurde in beiden Orientierungen komplett sequenziert. Der an einem Ende des Fragments liegende, 13 Reste lange GC-Schwanz beeinträchtigte weder die Synthesereaktion des Klenow-Enzyms noch die Auftrennung der Sequenz im Gel. Problematisch hingegen war die Sequenzierung des GC-Schwanzes am Fragment HC4PB320. Hier gelang lediglich die

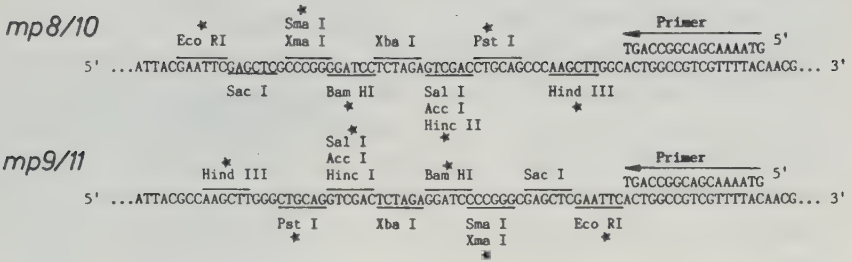


Abb. 13: Darstellung der Sequenzen der Klonierungsregion der M13mp8, mp9, mp10 und mp11 Vektoren, sowie der Hybridisierungsstelle des verwendeten M13-Universalprimers. Die DNA-Sequenz entspricht dem (+)Strang der Phagen-DNA.

Mit ★ gekennzeichnete Restriktionsstellen sind in den Vektoren mp8 und mp9 enthalten.

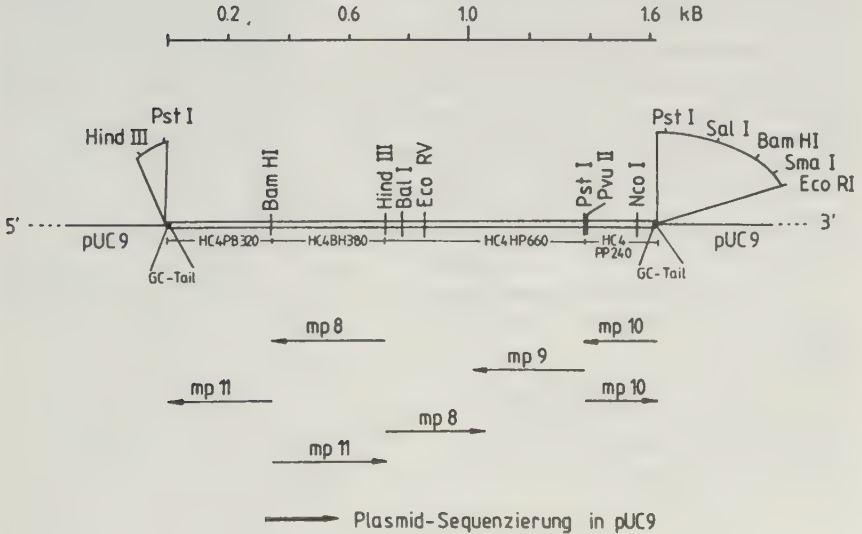


Abb. 14: cDNA Klon pH4: Lage der Subklone und sequenzierte Bereiche. Die Pfeile geben die Sequenzierrichtung und Länge an. Verwendete Primer: M13-Universalprimer
Hämocyanin "Kupfer A"-Oligonukleotidprobe (zur Plasmidsequenzierung).

Sequenzierung von der Bam HI Restriktionsstelle der cDNA aus. Der GC-Schwanz war an diesem Ende 21 Reste lang und verursachte Syntheseabbrüche, die auch durch eine Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 56 °C nicht beseitigt werden konnten. Das subklonierte Fragment HC4BH380 konnte in den Vektoren M13mp8 und mp11 wiederum durchgehend in beiden Orientierungen eindeutig lesbar sequenziert werden. Die Sequenz von HC4PH660 wurde durch Sequenzierung von beiden Fragmentenden her identifiziert. Im mittleren Teil des relativ langen Fragments überlappten die ermittelten Sequenzen auf einer Länge von 30 b. Die einzelnen Sequenzreaktionen wurden stets mehrfach durchgeführt. Es gab, auch bei der Sequenzierung des kodierenden und nichtkodierenden Stranges keine Unstimmigkeiten in den ermittelten Sequenzen. Abb. 15 zeigt ein Sequenzgel der Fragmente HC4PB320 und HC4BH380 als Beispiel für eine DNA-Sequenzierung an M13-Einzelstrang-Matrize.

Zusätzlich konnte ein 230 b langer Bereich in der Umgebung der "Kupfer A"-Sauerstoffbindungsregion durch Plasmidsequenzierung (CHEN and SEEBURG, 1985) mit Hilfe der "Kupfer A"-Oligonukleotidprobe bestätigt werden. Wegen der Heterogenität des als Sequenzprimer verwendeten Oligonukleotidgemisches wurden anstelle der sonst zur Plasmidsequenzierung eingesetzten 2 pM Primer 16 pM von diesem verwendet. Aus der Aneinanderreihung der DNA-Sequenzen der subklonierten cDNA ergab sich, ohne flankierende GC-Schwänze, eine Gesamtlänge von 1578 bp für die cDNA des Klon s pHc4.

In der Nukleinsäuresequenz einer der beiden komplementären cDNA-Stränge fand sich ein durchgehender Leserahmen, der sowohl zum 5'-Ende als auch zum 3'-Ende hin offen war. Der kodierende Strang ist mit seinem 5'-Ende zur Hind III/Pst I-Stelle des Vektors pUC9 orientiert (Abb. 14). Die Übersetzung der Codons in die Aminosäuresequenz ergab - außer an 12 Aminosäurepositionen - eine völlige Übereinstimmung mit der Aminosäuresequenz der Untereinheit e des Hämocyanins von *Eurypelma californicum*, wie sie auf proteinchemischem Weg

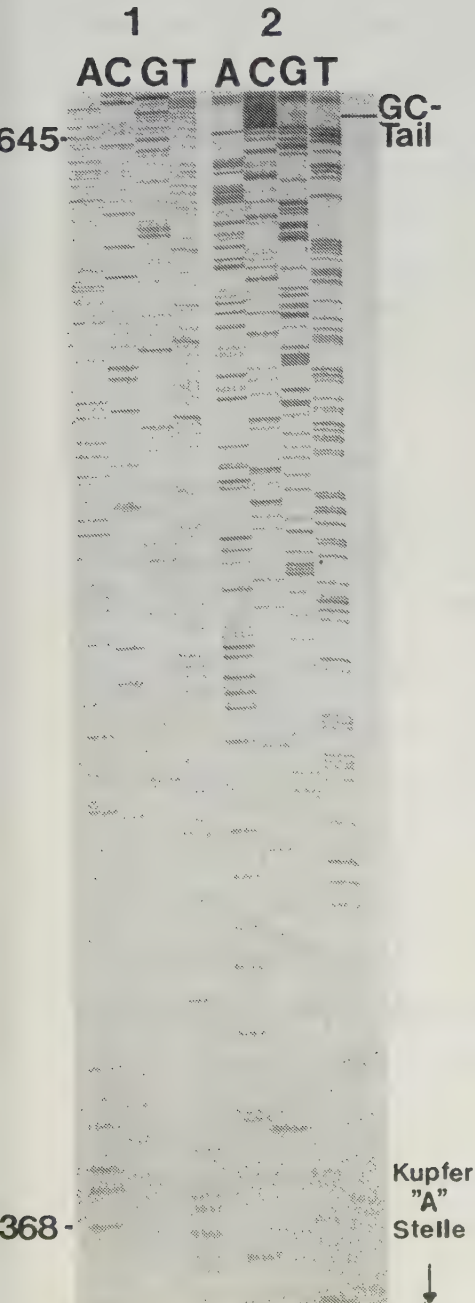


Abb. 15: Beispiel einer Sequenzierung im M13-System.

Es wurden Sequenzreaktionen der cDNA-Fragmente HC4BH380 in mp11 (1) und HC4PB320 (2) in denaturierendem (7 M Harnstoff) 6 %igem PAA-Gel in 1 x TBE-Puffer getrennt. Von Subklon HC4PB320 ist fast die gesamte Sequenz des Fragments abgebildet, die an einem Ende vom GC-Schwanz der cDNA begrenzt wird. Am unteren Gelende befindet sich ein Teil der "Kupfer A"-Sauerstoffbindungsstelle. Die Zahlen, die DNA-Banden des Subklons HC4BH380 markieren, entsprechen der Nummerierung der Nukleinsäuresequenz in Abb. 16.

Stromstärke der Elektrophorese: 28 mA

Temperatur: 56 °C

Geldickegradient: 0.1-0.4 mm

Radioaktives Nukleotid: α -³⁵S-dATP
(400 Ci/mM)

Das Gel wurde nach dem Lauf 30 min in 10 % Essigsäure gelegt, dann auf der Glasplatte getrocknet und 2 Tage mit KODAK X-OMAT AR Film bei RT exponiert.

GGT	CTA	CCA	TAT	GCT	TTC	CGT	CCT	GAT	GGT	CTT	TGC	TTG	CAC	GAT	CTG	549
G	L	P	Y	A	F	R	P	D	G	L	C	L	H	D	L	256
AAA	GAC	ATA	GAC	CTG	AAA	GAG	ATG	TTC	CGA	TGG	AGG	GAG	AGA	ATC	CTT	597
K	D	I	D	L	K	E	M	F	R	W	R	E	R	I	L	272
GAT	GCA	ATT	GAC	TCA	GGT	TAC	TAC	ATT	GAC	AAC	GAA	GGT	CAC	CAG	GTA	645
D	A	I	D	S	G	Y	Y	I	D	N	E	G	H	Q	V	288
AAG	CTC	GAC	ATC	GTT	GAT	GGA	ATT	AAT	GTC	CTG	GGT	GCT	CTC	ATT	GAA	693
K	L	D	I	V	D	G	I	N	V	L	G	A	L	I	E	304
TCA	AGC	TTC	GAA	ACA	AAG	AAC	AAG	CTG	TAC	TAC	GGT	AGT	CTT	CAC	AAC	741
S	S	F	E	T	K	N	K	L	Y	Y	G	S	L	H	N	320
TCG	GGC	CAT	GTA	ATG	---	ATG	GCC	AGA	TTG	CAA	GAC	CCT	GAT	CAC	AGA	786
W	G	H	V	M	K	M	A	R	L	Q	D	P	D	H	R	336
TTC	AAT	GAA	AAC	CCA	GGA	GTC	ATG	AGC	GAT	ACC	TCT	ACT	TCC	TTG	CGT	834
F	N	E	N	P	G	V	M	S	D	T	S	T	S	L	R	352
GAT	CCA	ATC	TTC	TAC	AGA	TAT	CAC	AGA	TTC	ATC	GAC	AAT	ATC	TTC	CAG	882
D	P	I	F	Y	R	Y	H	R	F	I	D	N	I	F	Q	368
AAA	TAC	ATA	GCC	ACT	TTG	CCT	CAT	TAC	ACT	CCA	GAA	GAT	TTG	ACA	TGT	930
K	Y	I	A	T	L	P	H	Y	T	P	E	D	L	T	C	384
CCA	GGA	GTT	CAC	GTA	GTC	AAC	GTA	ACA	GTG	AAT	GCC	AAG	GTT	CCA	AAT	978
P	G	V	H	V	V	N	V	T	V	N	A	K	V	P	N	400
GTG	GTA	ACA	ACT	TTC	ATG	AAG	GAA	GCT	GAA	CTG	GAA	CTC	TCA	TAT	GGC	1026
V	V	T	T	F	M	K	E	A	E	L	E	L	S	Y	G	416
ATC	GAC	TTC	GGA	AGT	GAC	CAT	TCT	GTG	AAG	GTA	CTG	TAC	CGC	CAC	TTG	1074
I	D	F	G	S	D	H	S	V	K	V	L	Y	R	H	L	432
GAT	CAC	GAA	CCC	TTC	ACT	TAC	AAC	ATC	AGC	GTC	GAG	AAC	TCA	TCT	GGT	1122
D	H	E	P	F	T	Y	N	I	S	V	E	N	S	S	G	448
GGT	GCT	AAC	GAC	GTG	ACA	ATG	CGT	ATT	TTC	CTC	GGC	CCT	AAG	TAT	GAC	1170
G	A	K	D	V	T	M	R	I	F	L	G	P	K	Y	D	464
GAA	TG	GGC	AAC	CGT	CTG	CAA	CCA	GAA	CAG	Q	AGG	ACC	CTG	AAC	ATC	1218
E	L	G	N	R	L	Q	P	E	Q	C	R	T	L	N	I	480
GAA	CTG	GAC	AAG	TTC	AAG	GCC	ACT	CTC	GAC	CCT	GGT	AAG	AAC	GTC	GTC	1266
E	L	D	K	F	K	A	T	L	D	P	G	K	N	V	V	496
ACA	CGT	GAC	CAC	CGT	AAT	TCA	ACT	GTA	ACT	GTT	GAA	CAA	AGC	GTC	CCA	1314
T	R	D	H	R	N	S	T	V	T	V	E	Q	S	V	P	512
GTA	AAG	AAA	CTG	CGT	GAG	GAA	GGA	GGC	GTT	GCT	GGA	GAA	TAC	TGC	AGC	1362
V	K	K	L	R	E	E	G	G	V	A	G	E	Y	C	S	528
TGC	GGA	TGG	CCT	GAA	CAC	ATG	CTC	ATC	CCC	AAA	GGA	AAC	CAC	AGG	GGC	1410
C	G	W	P	E	H	M	L	I	P	K	G	N	H	R	G	544
★	★	★	★	★	★	★	★	★	★	★	★	★	★	★	★	
ATG	GAC	TTC	GAA	CTC	TTC	GTC	ATT	GTA	ACA	GAC	TAC	GCT	CAG	GAT	GCT	1458
M	D	F	E	L	F	V	I	V	T	D	Y	A	Q	D	A	560
GTC	AAC	GGA	CAC	GGA	GAA	AAT	GCC	GAA	TGT	GTG	GAT	GCT	GTG	AGC	TAC	1506
V	N	G	H	G	E	N	A	E	C	V	D	A	V	S	Y	576
			★	★												
TGC	GGA	GCC	AAG	GAC	CAG	AAG	TAT	CCT	GAC	AAG	AAG	CCC	ATG	GGA	TTC	1554
C	G	A	K	D	Q	K	Y	P	D	K	K	P	M	G	F	592
CCA	TTC	GAT	AGA	GTC	ATC	GAA	GGA	3'								1578
P	F	D	R	V	I	E	G								COOH	600

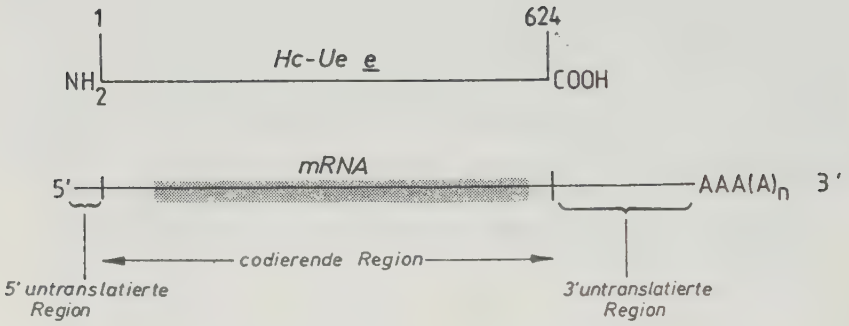


Abb. 17: Schematische Darstellung des Bereichs der Hämocyanin (=Hc)-mRNA (schattiert), dessen Nukleotidsequenz in Klon pHc4 enthalten ist.

IV. Hämocyanin-mRNA: Northernblotting und Hybridisierung mit Hc-cDNA pHc4

Nachdem eine für Hämocyanin codierende cDNA charakterisiert worden war, stand damit auch eine geeignete Hybridisierungsprobe zur Größenbestimmung der Hämocyanin-mRNA zur Verfügung. Das "Kupfer A"-Oligonukleotid konnte für diesen Zweck nicht verwendet werden, da seine Sequenz der codierenden Nukleinsäuresequenz entspricht.

6 µg Gesamt-RNA, isoliert aus *Eurypelma californicum* Herzgewebe, wurden mit Glyoxal und DMSO denaturiert (McMA-STER and CARMICHAEL, 1977), in einem 1 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert (THOMAS, 1980, 1983). Als Längenmarker dienten nicht radioaktiv-markierte λ /Hind III-Restriktionsfragmente, sowie 16 S rRNA (ca. 1500 b) und 23 S rRNA (ca. 3100 b) aus *E.coli*. Die Längenstandards waren gleichfalls denaturiert und wurden nach der Elektrophorese mit Ethidiumbromid angefärbt. Zur Hybridisierung des Northern-Blots diente das 1400 bp lange Pst I/Pst I-Restriktionsfragment von cDNA-pHc4 (Abb. 12). Das Fragment war durch Nick-Translation mit α - ^{32}P -dATP radioaktiv markiert worden. Wie Abb. 18 zeigt, hybridisierte das radioaktive Hc-cDNA-Fragment an eine mRNA-Spezies der Größe von 2.3 kb.

Die codierenden Sequenzen von mRNAs, deren Länge genau mit der Länge der Aminosäuresequenz der Polypeptidkette korreliert ist, werden von der 5'-untranslatierten und der 3'-untranslatierten Region mit dem Polyadenylierungssignal flankiert. Analysen verschiedener eukaryontischer mRNAs haben gezeigt, daß die Größen der 3'-untranslatierten Regionen je nach mRNA-Spezies, beträchtlich variieren: Sie sind oft kürzer als die codierende Region (z. B. Globin-mRNA), können jedoch auch etwa gleichlang wie der codierende Abschnitt sein (z. B. Hühner Ovalbumin-mRNA) oder viel länger als dieser (z. B. Neo-Endorphin-mRNA).



Abb. 18: Autoradiogramm eines Northern Blots mit RNA aus Eurypelma-Herzgewebe.

6 μ g Gesamt-RNA wurden mit 1 M Glyoxal und 50 % DMSO denaturiert und in einem 1-proz. Agarosegel aufgetrennt. Die auf Nitrocellulosepapier transferierte RNA wurde mit radioaktiv markiertem (α 32 P-dATP) 1400 bp Pst I-Fragment der cDNA-pHC4 hybridisiert. Die Position der E. coli rRNA Marker ist angegeben.

Waschen des Blots: 0.1 x SSC,
0,1 % SDS, 50 °C.

Exposition: 2 Tage mit Intensifizier
Screen.

Da die durch Oligo(dT)-gestartete cDNA-Synthese am äußersten Ende der 3'-untranslatierten Region beginnt, ist es nicht uninteressant zu wissen, wie groß dieser Abschnitt in der mRNA ist, die man vorzugsweise unter den cDNA-Transkripten wiederfinden möchte. Die 5'-untranslatierten Bereiche der mRNA-Spezies sind hingegen bezüglich ihrer Länge einheitlicher (durchschnittlich 60-150 b).

Im Falle der Hämocyanin-mRNA für *Ue e* umfaßt die codierende Region, nach der proteinchemischen Sequenzanalyse (SCHNEIDER et al., 1983) umgerechnet 1872 b. Aus den Hybridisierungen transferierter RNA (Abb. 18) ging hervor, daß die Gesamtlänge der mRNA für die *Ue e* etwa 2.3 kb beträgt. Damit entfielen auf die 5'- und 3'-untranslatierten Regionen zusammen lediglich 400 b.

V. Isolierung und Charakterisierung weiterer Hämocyanin-cDNA-Klone

1. Screening der Genbank II mit der "Kupfer A"- Oligonukleotidprobe

In Genbank I war mittels der Oligonukleotidprobe kein zweiter, hybridisierender cDNA-Klon entdeckt worden. So wurde eine weitere Genbank, cDNA-Genbank II, im Vektor pBR322 erstellt. Diese Genbank umfaßte 6200 cDNA-Klone (Tab. 5). Zum Screening wurden die Klone zunächst auf Nitrocellulosefilter übertragen, auf den Filtern kultiviert, sodann die Zellen lysiert und die DNA auf den Filtern denaturiert und fixiert (THAYER, 1979). Die anschließende Hybridisierung mit der mit γ - ^{32}P radioaktiv markierten "Kupfer A"-Oligonukleotidprobe führte zu keinem positiven Ergebnis. Zur Hybridisierung waren die Filter jeweils über Nacht bei 42 °C in 6 x SSC haltigem Hybridisierungspuffer (siehe Methodenteil) inkubiert worden. Stringent gewaschen wurde bei $T_{\text{Dmin}}=50$ °C in 6 x SSC/0.1 % SDS für 4 min. Um zu überprüfen, ob ungeeignete Bedingungen für die Koloniefixierung oder die Hybridisierung mit der Oligonukleotidprobe gewählt worden waren, wurden Kontrollversuche mit dem Hämocyanin-cDNA Klon pH4 durchgeführt. Dieser Klon erzeugte, unter gleichen Versuchsbedingungen, ein deutliches Hybridisierungssignal mit dem Oligonukleotid. So schien vielmehr in Genbank II kein Klon vorhanden zu sein, dessen cDNA-Transkript lange genug war, um auch das "Kupfer A"-Sauerstoffbindungszentrum des Proteins noch abzudecken.

Die "Kupfer A"-Region "H-H-W-H-W-H" liegt 167 Aminosäuren vom aminoterminalen Ende der Polypeptidkette entfernt: Das bedeutet, daß Sequenzen, die für diesen Teil codieren, mit Sicherheit nur in cDNAs ab einer Länge von etwa 1700 bp enthalten sein dürften. Die "Kupfer A"-Region kann sich dennoch in Klonen mit kürzeren cDNAs befinden, falls die cDNA-Erststrang-Synthese zusätzlich durch Sekundärstrukturen in der

mRNA gestartet wurde oder während der nachfolgenden Synthesereaktionen Endbereiche verloren gingen: Auch auf cDNA pHc4 fehlte ein etwa 400 b langer Sequenzbereich des 3'-Endes der zugehörigen mRNA.

2. Screening der cDNA-Genbanken III und IV mit pHc4-cDNA

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden nun die Genbanken III und IV in pUC19 erstellt und im folgenden ausschließlich mit diesen gearbeitet. Genbank III enthält insgesamt 3400, Genbank IV 27000 cDNA-Klone (Tab. 5). Als Hybridisierungsprobe diente in dieser neuen Versuchsreihe zunächst die Hämocyanin-cDNA des Klons pHc4. Die cDNA dieses Klons deckt einen recht großen Bereich der codierenden Sequenzen der Hämocyanin-mRNA ab. Es sollte also möglich sein, mit Hilfe dieser Probe ein größeres Spektrum an Hämocyanin-cDNA-Klonen zu identifizieren als dies mit einer einzigen Oligonukleotidprobe der Fall ist. Ferner sollten die Versuche die Frage klären, ob diese für die Hämocyanin-Untereinheit e spezifische cDNA - unter weniger stringenten Waschbedingungen - auch mit cDNA-Klonen hybridisiert, die für andere Hämocyaninuntereinheiten codieren (siehe C.V.4.).

Die cDNA-Klone, die zur Hybridisierung verwendet wurden, waren bei -70 °C auf Nitrocellulosefilter tiefgefroren. Zum Screening wurden die Koloniemuster der Masterfilter je zweimal auf frische Nitrocellulosefilter repliziert und diese Replikafilter zur Denaturierung der Bakterienkolonien und Fixierung der DNA nach THAYER (1979) behandelt. Die unspezifische Bindung von radioaktivem Material an die Filter konnte erheblich reduziert werden, indem die Filter nach Hitze-fixierung der DNA 16 Stunden lang in 3 x SSC, 0.1 % SDS bei 65 °C vorgewaschen wurden. Wie im Methodenteil beschrieben, wurden die Filter vorhybridisiert und, in Gegenwart von Formamid, über Nacht bei 42 °C mit dem ca. 1300 bp langen Bam HI/Bam HI - Restriktionsfragment der cDNA pHc4 (Abb. 19)

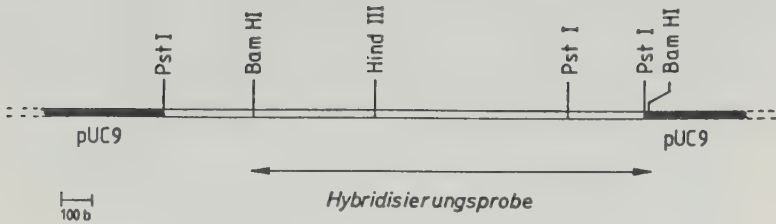


Abb. 19: Ein 1300 bp langes Bam HI/Bam HI-Restriktionsfragment der cDNA des Klon's pHC4 wurde als Hybridisierungsprobe zum Screening der Genbanken III und IV verwendet.

hybridisiert. In diesem Fragment ist die "Kupfer A"-Sauerstoffbindungsregion nicht mehr enthalten, jedoch die für den carboxyterminalen Bereich der Hc-Untereinheit e codierenden Sequenzen des Klon's. Das cDNA-Fragment war mit DEAE-Membranen aus Agarosegelen isoliert worden und mit α - ^{32}P -dATP radioaktiv durch Nick-Translation markiert. Dem Hybridisierungspuffer wurde jeweils 1×10^6 cpm radioaktiver Probe/ml zugesetzt.

Von Genbank III wurden bisher 1000 cDNA-Klone (30 %) mit dieser Probe hybridisiert, von Genbank IV ca. 5000 (18 %). In beiden Genbanken hybridisierten mehrere cDNA-Klone mit dem 1300 Bam HI/Bam HI-Fragment von pHC4. Unter den getesteten Klonen waren dies in Genbank III insgesamt 6 Klone und in Genbank IV insgesamt 10 Klone. Die Bezeichnung der Klone ist in Tabelle 8 angegeben. Abbildung 20 und 21 zeigen die über Kolonie-Hybridisierung als Hämocyanin-cDNA-Klone identifizierten Kolonien.

Genbank III			Genbank IV	
Filter		Klon	Filter A	
1		pHC132		pHCA1, pHCA2
2		-		pHCA56, pHCA59
3		pHC386, pHC393		pHCA76
4		pHC450, pHC488	B	pHCB1
5		-	C	pHCC1, pHCC5
6		pHC606	D	pHCD1, pHCD2
7		-		
8		-		
9		-		
10		-		

Tabelle 8: Auflistung der Kolonienfilter mit cDNA-Klonen aus den Genbanken III und IV, die zum Screening mit dem 1300 Bam HI/Bam HI-Restriktionsfragment von pHC4 verwendet wurden, sowie der cDNA-Klone, die positive Hybridisierungssignale erzeugten.

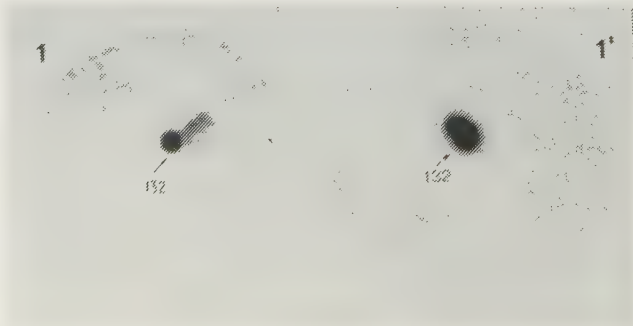
Abb. 20 A-D: Identifizierung von Hämocyanin-cDNA-Klonen in Eurypelma-cDNA-Genbank III.

Es sind jeweils parallele Filterreplikas dargestellt. Zum Screening diente nick-translatiertes α -³²P-markiertes 1300 Bam HI/Bam HI cDNA-Fragment des Klon pHC4. Koloniedichte: 100 Klone/Filter.

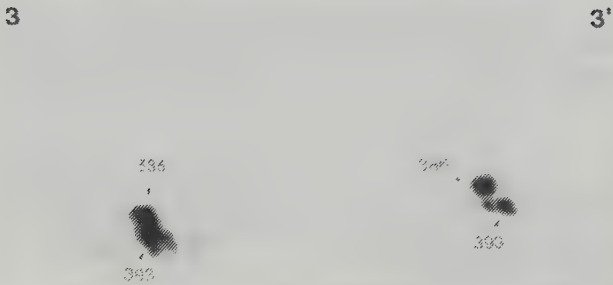
Hybridisierung: 50 % Formamid, 10 % (w/v) Dextransulfat, 6 x SSC, 0.1 % SDS, 100 µg/ml denaturierte Lachs-DNA, 1 x 10⁶ cpm radioaktive Probe/ml; Hybridisierungstemperatur: 42 °C, über Nacht.

Waschen: 2 x SSC, 0.1 % SDS, 2 x 15 min bei RT;
0.1 x SSC, 0.1 % SDS, 2 x 30 min bei 65 °C.

Exposition: 2-6 Stunden mit KODAK X-OMAT AR Filmen und Verstärkerfolien bei -70 °C.



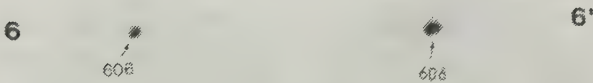
Filter Nr. 1: Klon pHC132



Filter Nr. 3: Klone pH386 und pH393



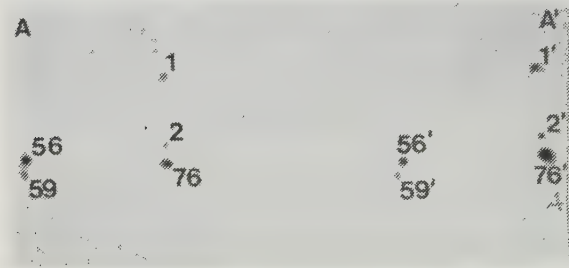
Filter Nr. 4: Klone pH450 und pH488



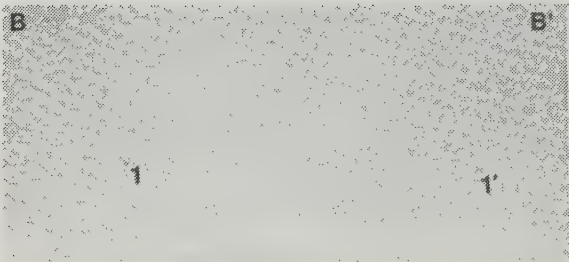
Filter Nr. 6: Klon pH606

Abb. 21 A-D: Hybridisierung der cDNA-Genbank IV aus Eurypelma-Herzgewebe mit nicktranslatiertem $\alpha^{32}\text{P}$ -1300 Bam HI/Bam HI cDNA-Fragment von Klon pHC4. Koloniendichte ca. 1300 pro Filter. (M), Markierungspunkte.

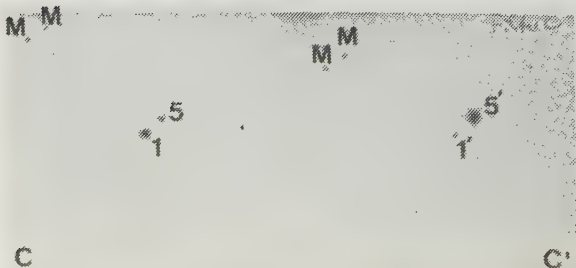
Hybridisierung und Waschen der Filter: siehe Legende zu Abb. 20
Exposition: Mit Intensifizier Screens über Nacht bei -70°C .



Filter A:
Klone pHCA1,
pHCA2, pHCA56,
pHCA59, pHCA76



Filter B:
Klon pHCB1



Filter C:
Klone pHCC1,
pHCC5

D

D'

Filter D:
Klone pHCD1,
pHCD2

*1

*2

*1'

*2'

In dieser gesamten Versuchsreihe waren sowohl für die Hybridisierung als auch für das Waschen unspezifisch gebundener Hybridisierungsproben stringente Bedingungen angewandt worden. Die genauen Bedingungen können den Legenden zu den Abbildungen 20 und 21 entnommen werden. Parallel hierzu wurden Kolonie-Hybridisierungen und Southern Blot-Hybridisierungen unter mäßig stringenten Bedingungen durchgeführt. Die hierbei gefundenen Resultate werden an späterer Stelle in diesem Kapitel dargelegt.

Zunächst wurden jedoch einige der neu identifizierten Hämocyanin-cDNA-Klone eingehender charakterisiert.

3. Charakterisierung und Sequenzanalyse von Hämocyanin-cDNA-Klonen aus den Genbanken III und IV

3.1. Southern Blot-Analyse positiver Klone

Die Klone der Genbank III befanden sich bereits im Rastermuster auf den Nitrocellulosefiltern, so daß positive Hybridisierungssignale auf dem Röntgenfilm ohne weitere Nachreinigung der Klone direkt einer individuellen Kolonie auf dem Masterfilter zugeordnet werden konnten. Die Plasmid-

DNAs der Klone pHC132, pHC386, pHC393, pHC450, pHC488 und pHC606 wurden isoliert und die Hybridisierung mit pHC4-cDNA im Southern-Blot bestätigt. Zur Ermittlung der Längen der im Vektor pUC19 inserierten cDNAs wurden die rekombinanten Plasmide mit dem Enzym Pst I geschnitten und im Agarosegel analysiert. Unter den getesteten positiven Klonen besaß lediglich die cDNA des Klons pHC450 eine interne Pst I-Stelle. Abbildung 22 zeigt die Analyse der Plasmid-DNAs dieser neuen Hämocyanin-Klone im Southern-Blot. Bei vier der sechs Klone hatte die inserierte cDNA fast identische Längen von etwa 300 bp.

Die Klone der cDNA-Genbank IV hingegen waren ursprünglich direkt auf Nitrocellulosefilter ausplattiert worden. Daher konnten die echten, Hämocyanin-cDNA-enthaltenden Klone erst nach einem Nachreinigungsschritt gewonnen werden: Kolonien im Bereich positiver Hybridisierungssignale wurden einzeln auf frische Nitrocellulosefilter transferiert und kultiviert. Nach der Rehybridisierung dieser Kolonie-Filter mit der Hämocyanin-spezifischen cDNA-Probe pHC4 (1300 Bam HI/Bam HI) waren echte Hämocyanin-cDNA-Klone an der positiven Hybridisierungsreaktion erkennbar. Nachgereinigt wurden die Klone der Filter A und C. Von den nachgereinigten Klonen wurden die cDNAs von pHCA56, pHCA59, pHCA76 und pHCC5 mit Pst I restringiert und die Southern-Blots der auf Nitrocellulose transferierten DNA mit pHC4-cDNA erneut hybridisiert. Das Ergebnis zeigt Abb. 23.

Wie die Restriktionsanalyse der isolierten Plasmid-DNAs zeigte, waren die einzelnen cDNAs zwischen etwa 300 bp (Klon pHC488/606) und 850 bp (Klon pHC450) lang (Tab. 9). Demnach waren die neu gefundenen Hämocyanin-cDNAs aus den Genbanken III und IV durchweg kürzer als diejenige des Klons pHC4. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit der qualitativen Analyse der Produkte der Erststrang-cDNA-Synthese (siehe C.II.), die gezeigt hatte, daß die Transkriptlänge der cDNAs III und IV hauptsächlich 200-800 b betrug. Angaben zur Länge der analysierten cDNAs sind in Tab. 9 zusammengestellt.

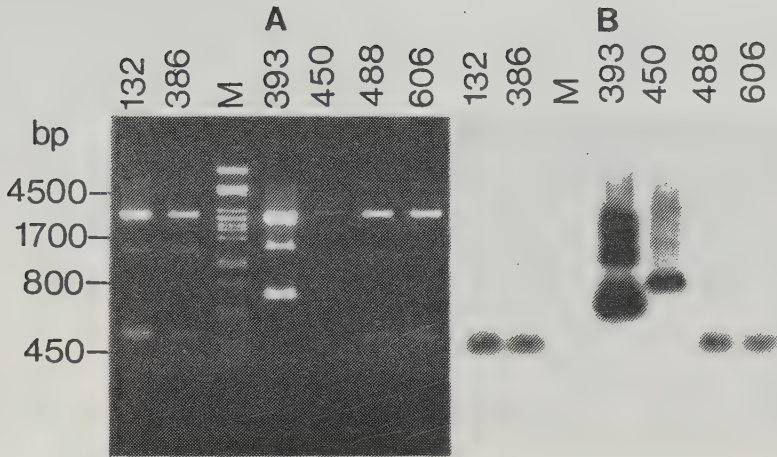


Abb. 22: cDNA-Klone pHCl32, pHCl386, pHCl393, pHCl450, pHCl488 und pHCl606 der Genbank III: Restriktion mit Hind III und Bam HI, sowie Southern-Blotting.

A: 1.2 %iges Agarosegel, gefärbt mit Ethidiumbromid.
Klon pHCl393 war lediglich partiell gespalten.

B: Hybridisierung des Southern Blots von (A) mit radioaktiv mit α - 32 P markiertem 1300 Bam HI/Bam HI-Fragment des Klon pHCl4.

Marker: λ -DNA, gespalten mit Pst I

Exposition des Autoradiogramms: 2 Stunden mit Verstärkerfolien.

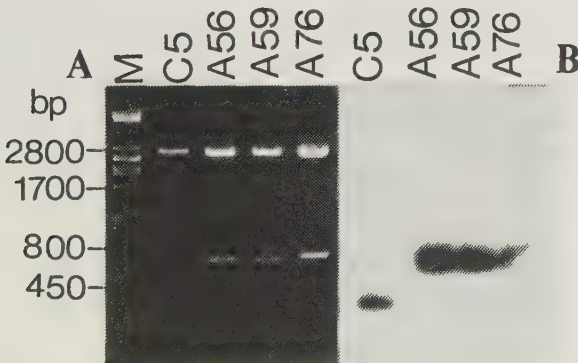


Abb. 23: cDNA-Klone pHCA56, pHCA59, pHCA76 und pHCC5 der Genbank IV. Southern-Blot-Analyse der mit Pst I restringierten cDNAs.

A: 1.2 %iges Agarosegel, gefärbt mit Ethidiumbromid. DNA teils nur partiell gespalten.

B: Southern-Blot des Agarosegels; Hybridisierung, siehe Legende Abb. 22.

Marker: λ -DNA, restringiert mit Pst I

Genbank	Klonbezeichnung	Länge der cDNA (bp)
III	pHC132	350
	pHC386	350
	pHC393	600
	pHC450	850
	pHC488	300
	pHC606	300
IV	pHCA56	600
	pHCA59	600
	pHCA76	650
	pHCC5	620

Tabelle 9: Längenangaben zu Hämocyanin-cDNAs aus Klonen der Genbanken III und IV, die mit dem 1300 Bam HI/Bam HI-Fragment der cDNA des Hämocyanin-Klons pHc4 hybridisierten.

Diese Hämocyanin-cDNAs wurden auf interne Restriktionsstellen für die Enzyme Hind III, Bam HI, Eco RI und Pvu II getestet. Unter den aufgeführten Enzymen spaltete lediglich Pvu II die cDNA der Klone pHc450, pHCC5 und pHc393. Für eine exemplarische Sequenzanalyse wurden aus der Genbank III die Klone pHc393 und pHc450 gewählt, da sie noch relativ lange cDNAs enthielten, sowie aus Genbank IV der Klon pHCC5.

Zur Etablierung von Subklonen, die für eine DNA-Sequenzanalyse der Gesamt-cDNAs benötigt wurden, wurden Deletionsmutanten konstruiert.

3.2. Prinzip der Konstruktion von Deletionsmutanten mit Exonukleasen III/VII und Plasmidsequenzierung

Das Prinzip der Konstruktion von Deletionsmutanten ist in Abb. 24 schematisch für den cDNA-Klon pHc393 dargestellt. Das gleiche Verfahren wurde auch für die Klone pHc450 und pHCC5 angewandt.

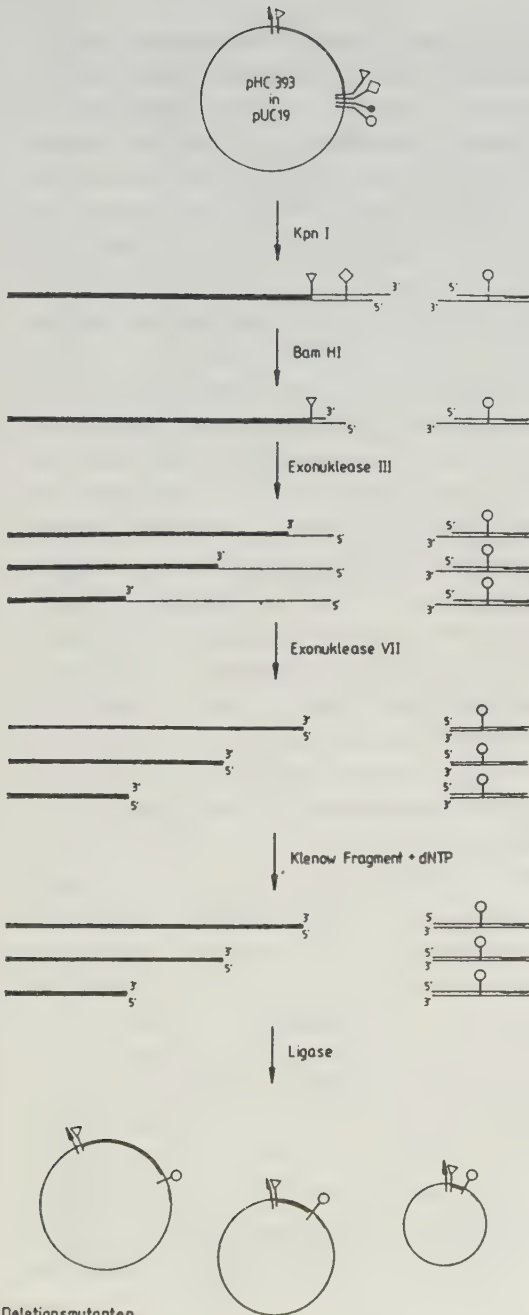


Abb. 24: Prinzip der Herstellung von Deletionsmutanten mit Exonukleasen III und VII am Beispiel von Klon pH393.

Deletionsmutanten

Die cDNA des Klons pH393 ist über GC-Schwänze in die Pst I Stelle des Vektors pUC19 inseriert und enthält, wie Restriktionsanalysen zeigten, ebenso wie pH450-cDNA und pHCC5-cDNA, keine internen Schnittstellen für die Enzyme Bam HI und Kpn I. Daher eignen sich diese beiden Enzyme bei allen drei Klonen zur Erzeugung Exonuklease III-sensitiver und Exonuklease III-resistenter DNA-Enden. Durch Linearisierung der pUC19-DNA mit dem Enzym Kpn I (Erzeugung 3'-überstehender Enden) wurde das der Hybridisierungsstelle des Sequenzier-Primers zugewandte DNA-Ende vor Exonuklease-Abbau geschützt. Anschließend wurde durch Bam HI-Restriktion kurz vor der cDNA-Insertionsstelle das für Exonuklease III-sensitive, 3'-zurückgesetzte DNA-Ende geschaffen. Durch die Enzymaktivitäten von Exonuklease III/VII wird die Plasmid-cDNA, in Abhängigkeit von der Inkubationszeit, von der Bam HI-Stelle aus sukzessive abgebaut. Ein Beispiel für den zeitabhängigen Verdau mit Exonuklease III/VII ist in Abb. 26 wiedergegeben. Nach Abbruch des Nuklease-Verdau werden die entstandenen DNA-Strangenden mit DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) aufgefüllt und mit DNA-Ligase wieder miteinander verbunden. Mit den Nuklease-Abbaureaktionen der Inkubationszeiten, die, nach Gelanalyse, DNA-Deletionen in gewünschtem Ausmaß erzeugt hatten, wurden kompetente *E. coli* DH5 α Zellen oder *E. coli* JM109 Zellen transformiert. Die Transformationsrate betrug jeweils ca. 2×10^4 Transformanten pro Ligationansatz einer Zeitprobe. Die Größe der Deletionen hatte keinen Einfluß auf die Transformationsrate. Damit steht ein großes Sortiment unterschiedlich deletierter cDNA-Klone zur Verfügung. Zur Bestimmung der Insertlängen der einzelnen Deletionsmutanten wurden zwischen 5 und 10 cDNA-Klone ausgesuchter Abbaupzeiten in kleinem Maßstab (5 ml Übernachtskultur) kultiviert, die Plasmid-DNA nach der Alkali-Aufschluß-Methode (BIRNBOIM and DOLY, 1979) isoliert und die Größe der cDNA nach Restriktion mit Eco RI und Hind III durch Elektrophorese in Agarosegelen abgeschätzt. Auf diese Weise konnten Deletionsklone mit cDNAs geeigneter Längen für die DNA-Se-

quenzierung zusammengestellt werden.

Die Sequenzierung dieser Deletionsmutanten wurde ausschließlich nach der Dideoxymethode im Plasmid pUC19 durchgeführt (CHEN and SEEBURG, 1985). Dadurch entfallen die zeitraubenden Schritte der Fragment-Isolierung und Klonierung in den Phagen. Nach CHEN und SEEBURG wird der rekombinante Plasmid-DNA-Doppelstrang durch kurze Alkalibehandlung in die einzelsträngige, circuliäre Form überführt, so daß, analog zur Sequenzierung im M13-System, der Sequenzierprimer an die komplementäre Sequenz auf dem pUC-Plasmid binden kann. Zur Sequenzierung im pUC-System wurde der gleiche Universal-Sequenzierprimer verwendet wie für die Sequenzierung mit M13-DNA, sowie zusätzlich dazu ein "M13-Reverse"-Sequenzierprimer (BIOLABS) (Abb. 25). In einigen Punkten wurde die Vorschrift von CHEN und SEEBURG (1985) modifiziert und dadurch bessere Sequenzierresultate erzielt:

- Zur Entfernung der RNA aus der minipräparativen Plasmidisolierung (BIRNBOIM and DOLY, 1979) wurde, nach Verdau mit RNase, mit PEG/NaCl gefällt (HATTORI and SAKAKI, 1986). PEG-Rückstände mußten jedoch sorgfältig vom DNA-Pellet entfernt werden, da andernfalls bei der Sequenzierungsreaktion massive Strangabbrüche und Hintergrundbanden zu beobachten waren. Diese Probleme waren bei Sequenzreaktionen im M13-System bislang nicht aufgetaucht.
- Für die Plasmidsequenzierung wurde eine gleichermaßen niedrige Konzentration an Primer eingesetzt wie für die

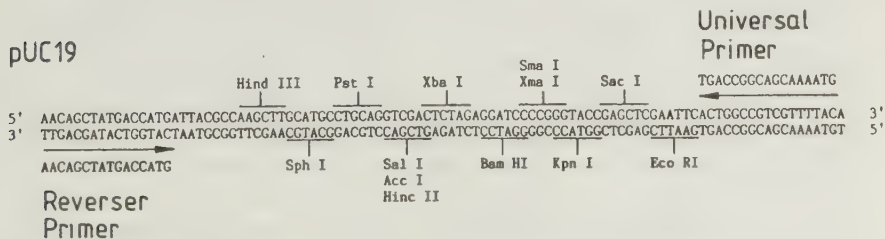


Abb. 25: Darstellung der zur Plasmidsequenzierung verwendeten M13-/pUC-Sequenzierprimer.

Sequenzierung an M13-Einzelstrang-DNA als Template, nämlich 2 pM. Die "Annealing"-Temperatur wurde auf 56 °C erhöht. CHEN und SEEBURG verwendeten, bei gleicher Menge an DNA-Template, 5 pM 17-mer Sequenzierprimer und führten das "Annealing" bei 37 °C durch.

3.3. cDNA-Klon pH393

Wie im vorherigen Kapitel beschrieben, wurden von pH393-cDNA Deletionsmutanten hergestellt (Abb. 26). Um ein geeignetes Sortiment an Subklonen zur Sequenzierung der Gesamt-cDNA zusammenzustellen, wurden Einzelkolonien aus verschiedenen Inkubationszeiten mit Exonuklease III kultiviert und minipräparativ die Plasmid-DNA exemplarisch ausgesuchter Deletionsmutanten isoliert. Die Länge der deletierten cDNA wurde nach Restriktion mit Hind III und Eco RI im Agarosegel elektrophoretisch überprüft. Abb. 27 zeigt das Ausmaß der Deletionen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer mit Exonuklease III.

Zur Bestimmung der Nukleotidsequenz von pH393 wurde zunächst die gesamte cDNA von beiden cDNA-Enden mit Universalprimer und reversem Primer in pUC19 sequenziert. Die flankierenden GC-Schwänze waren lediglich 10- bzw. 13-Reste lang und stellten somit kein Problem für die Sequenzierung dar. Die untersuchte cDNA enthält an einem Ende eine homopolymere Sequenz aus 17 (A)-Resten. 20 Nukleotide "stromaufwärts" davon wurde die Sequenz 5'-"AAATAAAAA"-3' gefunden. In dieser Sequenz ist das als Polyadenylierungssignal geltende, charakteristische Hexanukleotid "AAUAAA" enthalten. Die Sequenz AAUAAA kommt gewöhnlich sowohl in zellulären als auch in viralen polyadenylierten RNAs höherer Eukaryonten, selten jedoch bei Hefen, vor. Sie liegt auf der mRNA typischerweise 11 bis 30 Nukleotide "stromaufwärts" vor dem Beginn des poly(A)-Schwanzes. In Abb. 28 sind die zur Sequenzierung verwendeten Deletionsmutanten dargestellt, sowie die Rich-

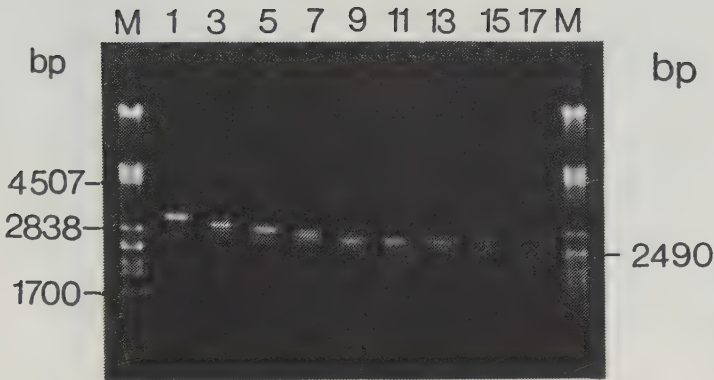


Abb. 26: Analyse des Ausmaßes an Deletionen durch Elektrophorese in 1.2 %igen Agarosegelen. Der Exonuklease-Abbau wurde nach 1, 3, 5 min usw. gestoppt und ein Teil des Probenmaterials nach Behandlung mit Exonuklease VII im Gel analysiert. Das Agarosegel zeigt Deletionsmutanten des Klons pH393. Marker: λ /DNA, restringiert mit Pst I.

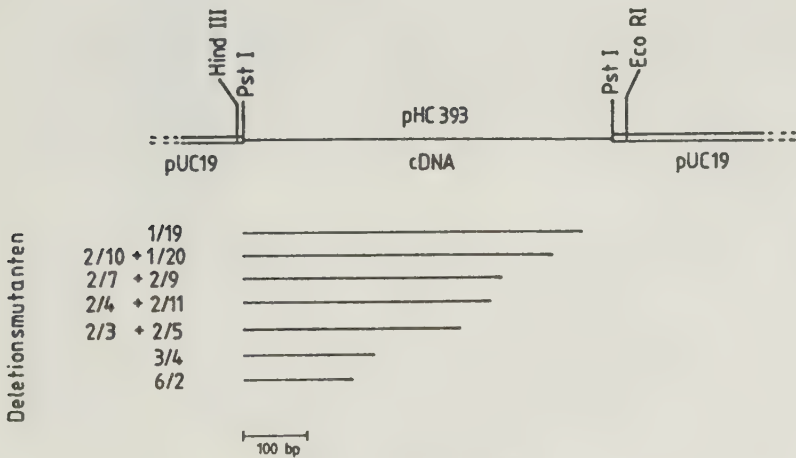


Abb. 27: Konstruktion von Deletionsmutanten des Klons pH393. Darstellung des Ausmaßes an DNA-Deletion nach 1-minütiger (1/19; 20), 2-minütiger (2/3-5; 7; 9-11), 3-minütiger (3/4), sowie 6-minütiger (6/2) Inkubation mit Exonuklease III.

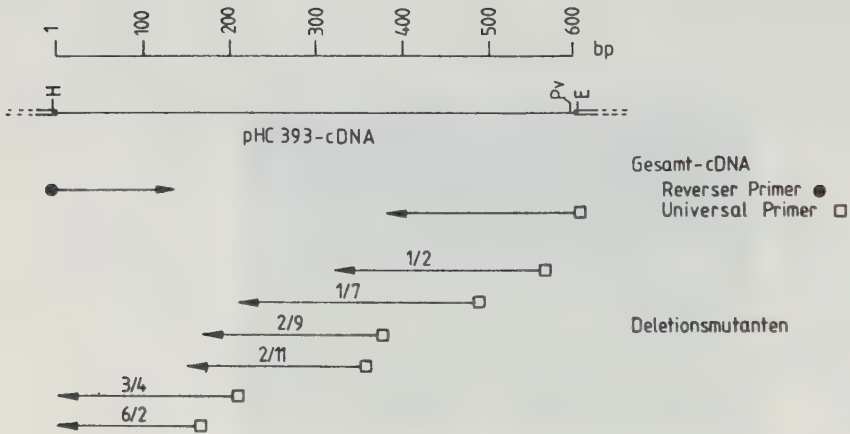


Abb. 28: Sequenzanalyse von Deletionsmutanten des Klons pHc393.

Länge und Orientierung der gelesenen Einzelsequenzen.

H: Hind III

E: Eco RI

Pv: Pvu II

tung und Länge der im Gel gelesenen Sequenzen der Subklone. Alle Sequenzanalysen wurden direkt im Plasmid pUC19 nach der Dideoxymethode durchgeführt. Abb. 30 zeigt exemplarisch eine Plasmidsequenzierung von Gesamt-pHC393-cDNA mit 17-mer Universalprimer.

Wie die Sequenzanalyse von pHc393 zeigte, enthält die cDNA dieses Klons die gesamte 3'-untranslatierte Region einschließlich des Polyadenylierungssignales AATAAA, sowie 17 Reste des poly(A)-Schwanzes. Die Länge der untranslatierten Region ist, verglichen mit der Größe des Protein-codierenden Bereichs der Hämocyanin-mRNA, recht klein. cDNA pHc393 codiert ferner für 98 Aminosäuren des carboxyterminalen Proteinbereichs der Hämocyanin-Untereinheit e. Zur Termination der Proteinbiosynthese besitzt die mRNA das Stoppcodon UAG. Abb. 30 zeigt die gesamte Nukleotidsequenz von pHc393 und, für den codierenden Bereich, die von der DNA-Sequenz

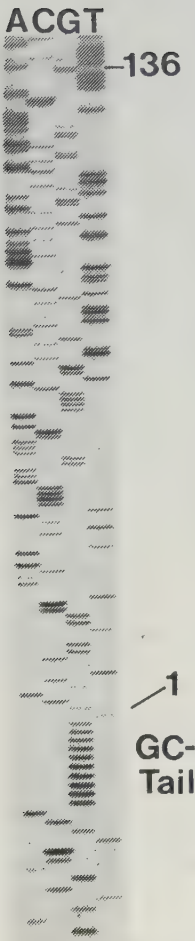


Abb. 29: Plasmidsequenzierung von pHC393-cDNA in Vektor pUC19.

Im abgebildeten Beispiel wurden 3 µg nicht-deletierte Plasmid-cDNA (siehe auch Abb. 28,) nach Denaturierung mit Alkali (CHEN and SEEBURG, 1985) mit 2 pM M13-Universalprimer und $\alpha^{35}\text{S}$ -dATP nach der Dideoxymethode sequenziert.

Gel: 6 % PAA, 7 M Harnstoff, 1 x TBE, Geldicke: 0.1 mm-0.4 mm (unten) Elektrophorese: 30 mA; Gel auf 56 °C thermostatisiert.

abgeleitete Aminosäuresequenz. Zu den bereits aus cDNA pHC4 bekannten Codons konnte die fehlende DNA-Sequenz am Carboxylende des Proteins ergänzt werden. In diesem neuen Bereich wurden an sieben Positionen von der proteinchemischen Bestimmung abweichende Aminosäuren gefunden. Soweit cDNA pHC4 und cDNA pHC393 in ihren DNA-Sequenzen überlappen, konnten keine Abweichungen in den Nukleotidsequenzen beider Klone festgestellt werden.

TGC	AGC	TGC	GGA	TGG	CCT	GAA	CAC	ATG	CTC	ATC	CCC	AAA	GGA	AAC	CAC	AGG	51 (1407)	
C	S	C	G	W	P	E	H	M	L	I	P	K	G	N	H	R		
		★	530	★									540					
GGC	ATG	GAC	TTC	GAA	CTC	TTC	GTC	ATT	GTA	ACA	GAC	TAC	GCT	CAG	GAT	GCT	102 (1458)	
G	M	D	F	E	L	F	V	I	V	T	D	Y	A	Q	D	A		
						550										560		
GTC	AAC	GGA	CAC	GGA	GAA	AAT	GCC	GAA	TGT	GTG	GAT	GCT	GTG	AGC	TAC	TGC	153 (1509)	
V	N	G	H	G	E	N	A	E	C	V	D	A	V	S	Y	C		
	★		★	★					570									
GGA	GCC	AAG	GAC	CAG	AAG	TAT	CCT	GAC	AAG	AAG	CCC	ATG	GGA	TTC	CCA	TTC	204 (1560)	
G	A	K	D	Q	K	Y	P	D	K	K	P	M	G	F	P	F		
		580										590						
→																		
GAT	AGA	GTC	ATC	GAA	GGA	TTG	ACC	CTT	GAA	GAA	TTT	CTA	ACT	CCG	AGC	ATG	255 (1611)	
D	R	V	I	E	G	L	T	L	E	E	F	L	T	P	S	M		
					600			★						★	610			
AGC	TGC	ACT	GAT	GTC	AGG	ATT	AAG	TAC	ACC	GAT	ATC	AAA	TAG	ACACAGAAATC			308 (1664)	
S	C	T	D	V	R	I	K	Y	T	D	I	K	Stop					
								620										
ACTGAAGAAAGGATAAAAAACAAAGACCTTCTAAATTATCTCAAACCTTTCGAGCAGCCCTTCGCATAC																		375 (1731)
CTTTCAAAAAATTAAACCGGAAGTCTTTTTACCTTGCCCGCAGCATATCAAAACAAACGAAATGTTCA																		442 (1798)
TCAGTCAGAATGTAAACCTTTTTAAAAATTCTAACACTGGCCCTTTTTTTGTATAACTAACACCCAAT																		509 (1865)
AGTTGTACAGATTGTGCATGTTTATGTACTTGGAATATTGTTTACGAAGTGAATATAAAAGTATTTC																		576 (1932)
GACAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA																		598 (1954)
→																		
Poly(A)-Schwanz																		

Abb. 30: Nukleotidsequenz des Klons pH393.

cDNA pH393 enthält die Codons für 98 Aminosäuren des carboxyterminalen Bereichs der Hämocyanin-Untereinheit ϵ (Aminosäureposition 527-642) von *Eurypelma californicum*, sowie die gesamte 3'-untranslatierte Region der Hämocyanin-mRNA, die das Polyadenylierungssignal AAUAAA aufweist. Die mit cDNA pH4 überlappenden Nukleotidsequenzen sind mit Pfeil gekennzeichnet, Unterschiede zur proteinchemischen Aminosäurebestimmung sind mit (★) markiert. Die Nummerierung der Nukleotide in Klammer entspricht den Positionen in Abb. 37.

3.4. cDNA-Klone pH450 und pHCC5

Unter den cDNA-Klonen, die mit der Hämocyanin-cDNA Probe pH4 hybridisierten, wurden neben pH393 der Klon pH450 aus Genbank III und der Klon pHCC5 aus Genbank IV zur Analyse auf Nukleotidsequenzebene ausgewählt. Damit sollte bestätigt werden, daß es auf DNA-Ebene, trotz großer Homologien in der Aminosäuresequenz der einzelnen Untereinheiten des Hämocyanins von *Eurypelma californicum*, zu keinen Kreuzhybridisierungen kommt.

Die cDNA des Klon pH450 ist mit einer Länge von 850 bp unter den neu gefundenen Hämocyanin-cDNA-Klonen am umfangreichsten. Ein ca. 300 bp langer Abschnitt der cDNA wurde im Plasmid pUC19 sequenziert. Wegen langer GC-Reste an den Enden der cDNA konnten DNA-Sequenzen erst nach der Konstruktion von Deletionsmutanten gewonnen werden. Abb. 31 stellt die mit zwei Deletionsmutanten sequenzierten cDNA-Bereiche dar. Die cDNA-Sequenz der beiden Subklone 3/1 und 3/4 ist vollkommen identisch mit den entsprechenden cDNA-Sequenzen von

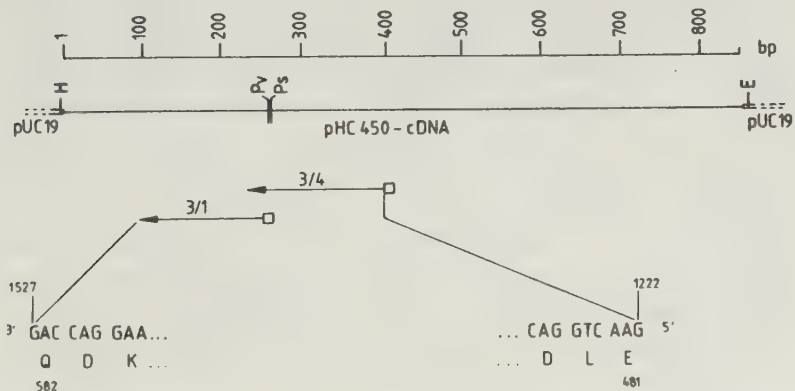


Abb. 31: Hämocyanin-cDNA-Klon pH450.

Lage und Orientierung der sequenzierten Deletionsmutanten 3/1 und 3/4 von Klon pH450. Die Enden der sequenzierten Bereiche sind dargestellt, die Nummerierung der Nukleotide und Aminosäuren bezieht sich auf Abb. 37 (Kapitel C.VI.).

H: Hind III, E: Eco RI, Pv: Pvu II, Ps: Pst I
□: Universalprimer

pHC4 und pHC393. Auf eine gesamte Sequenzanalyse dieses cDNA-Klons wurde daher verzichtet. Aus Agarosegel-Analysen geht hervor, daß pHC450-cDNA ca. 590 Basen "stromaufwärts" der Pst I-Stelle enthält, sowie bis ca. 260 Basen "stromabwärts" dieser Stelle reicht.

Gleichfalls für die Hämocyanin-Untereinheit e codierte der Klon pHCC5. Die Gesamt-cDNA wurde mit reversem Sequenzierprimer von einem Ende über 200 b ansequenziert. Die ermittelte DNA-Sequenz liegt im codierenden Bereich der Hämocyanin-mRNA für Untereinheit e. Lage und Länge des sequenzierten Bereichs ist in Abb. 32 dargestellt. Es wurden wiederum keine Unterschiede in den Sequenzen zu den entsprechenden DNA-Abschnitten der Klone pHC4 und pHC450 gefunden. Auch pHCC5 wurde nur teilweise sequenziert.

Ein Überblick über die Lage der charakterisierten cDNA-Klone pHC4, pHC393, pHC450 und pHCC5 zueinander, sowie eine Zusammenfassung der Sequenzen wird in Punkt C.VI. gegeben.

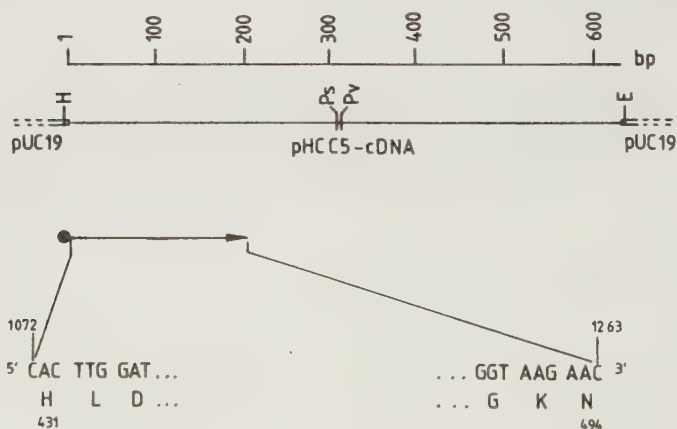


Abb. 32: Hämocyanin-cDNA-Klon pHCC5.

Sequenzierung eines terminalen Bereichs der cDNA mit reversem Sequenzierprimer. Die Enden des sequenzierten Bereichs sind dargestellt, die Nummerierung der Nukleotide und Aminosäuren bezieht sich auf Abb. 37 (Kapitel C.VI.).

H: Hind III, E: Eco RI, Pv: Pvu II, Ps: Pst I

•: reverser Sequenzierprimer

4. Hybridisierung unter mäßig stringenten Bedingungen

Die über Hybridisierung mit spezifischer cDNA-Probe für Eurypelma Hämocyanin-Untereinheit e gefundenen Klone enthielten, soweit über Sequenzanalyse bestätigt, ausschließlich die genetische Information für Untereinheit e. Aufgrund der großen Homologiebereiche (Abb. 33), die zwischen den bislang proteinchemisch ermittelten Aminosäuresequenzen dreier verschiedener Untereinheiten von Eurypelma-Hämocyanin existieren, stellt sich die Frage, ob sich eine für Untereinheit e spezifische cDNA-Probe auch zum Auffinden von Hämocyanin-cDNAs eignet, die für weitere Untereinheiten codieren.

Um diese Frage zu klären, wurden Hybridisierungen unter mäßig stringenten Bedingungen durchgeführt. Nach ANDERSON und YOUNG (1985) verursachen 1 % Basenfehlpaarung eine Erniedrigung der Schmelztemperatur des Hybrids um 0,5 bis 1.4 °C, je nach GC-Gehalt. Die Stabilität der Hybride verwandter Sequenzen wird auch stark von der Verteilung der Basenfehlpaarungen beeinflusst. Theoretisch betrachtet kann selbst in stark konservierten Aminosäureabschnitten der Untereinheiten wegen der Degeneration des genetischen Codes mindestens jedes dritte Nukleotid der DNA-Sequenz variieren.

Experimentell wurde so vorgegangen, daß zwar die Hybridisierungsbedingungen beibehalten wurden (50 % Formamid, 6 x SSC, 0.1 % SDS, 5 x Denhardt's, 0.1 mg/ml denaturierte Lachs-DNA, 1 x 10⁶ cpm/ml $\alpha^{32}\text{P}$ -markierte Probe 1300 Bam HI/Bam HI-Fragment von pHc4), jedoch unter verminderter Stringenz gewaschen wurde. Die Waschtemperatur wurde sukzessive um 5 °C von 65 °C bis auf 45 °C gesenkt, der verwendete Waschpuffer enthielt 2 x SSC, 0.1 % SDS. Unter keiner der bei reduzierter Stringenz durchgeführten Hybridisierungsbedingungen konnten jedoch Hämocyanin-cDNA-Klone gefunden werden, die für andere Untereinheiten codierten. Die niedrigen Waschtemperaturen und die höhere Ionenstärke des Waschpuffers erhöhten unspezifische Hintergrundsignale auf den Kolo-

110																														120																														130																																																											
NH ₂	..	I	A	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	S	A	E	V	A	L	L	H	R	E	D	C	R	G	V	T	V	P	P																																																																																							
NH ₂	..	L	A	T	N	A	R	A	V	V	N	E	G	L	Y	A	F	A	M	S	V	A	L	L	S	R	D	D	C	N	G	V	T	V	P	P																																																																																			
NH ₂	..	L	A	K	Q	S	R	T	F	V	N	E	G	L	F	V	Y	A	V	S	V	A	L	L	H	R	D	D	C	K	G	I	V	V	P	A																																																																																			
140																														150																														160																														170																													
V	Q	E	V	F	A	D	R	F	I	P	A	D	S	I	N	I	A	F	T	I	A	T	T	Q	P	G	D	E	S	D	I	-	V	V	D	K	D	T																																																																																	
I	Q	E	V	F	P	D	R	F	V	P	A	E	T	I	N	R	A	L	K	V	D	K	I	S	D	P	N	K	D	T	-	I	-	V	P	T	Q	K	T																																																																																
I	Q	E	I	F	P	D	R	F	V	P	T	E	T	I	N	L	A	V	K	E	A	A	N	H	P	D	Q	I	S	-	-	-	V	H	V	E	I	T																																																																																	
180																														190																														200																														210																													
G	N	L	L	D	P	E	Y	K	L	A	Y	F	R	E	D	I	G	V	N	A	H	H	W	H	W	H	V	V	P	S	T	Y	D	P	A	F	F	G																																																																																	
G	N	I	R	D	P	E	Y	N	V	A	Y	F	R	E	D	I	G	I	N	S	H	H	W	H	W	H	L	V	V	P	A	F	Y	D	A	P	F	F	G																																																																																
G	N	I	L	D	E	E	Y	K	L	A	Y	F	R	E	D	V	I	G	T	N	A	H	H	W	H	W	H	I	V	V	P	A	T	W	D	P	A	F	M	G																																																																															
220																														230																														240																														250																													
K	V	K	D	R	K	G	E	L	F	Y	M	H	Q	Q	M	C	A	R	Y	D	C	E	R	L	S	N	G	L	N	R	M	I	P	F	H	N	F	N																																																																																	
K	V	K	D	R	K	G	E	L	F	Y	M	H	Q	Q	M	C	A	R	Y	D	C	E	R	L	S	N	G	L	N	R	M	I	P	F	F	Q	N	I	D																																																																																
R	M	K	D	R	K	G	E	L	F	Y	M	H	Q	Q	M	C	A	R	Y	D	C	E	R	L	S	N	G	M	R	M	I	P	F	S	N	F	D																																																																																		
260																														270																														280																														290																													
E	P	L	G	G	Y	A	A	H	L	T	H	V	A	S	G	R	H	Y	A	Q	R	P	D	G	L	A	M	H	D	V	R	E	V	-	D	V	Q	D	M																																																																																
D	E	L	E	G	Y	S	P	H	L	S	S	L	V	S	G	L	S	Y	G	S	R	P	A	G	M	H	L	R	D	I	N	D	C	-	-	S	V	Q	M																																																																																
E	K	L	E	G	Y	S	A	H	L	T	S	L	V	S	G	L	P	Y	A	F	R	P	D	G	L	C	L	H	D	L	K	D	I	-	D	L	K	E	M																																																																																
300																														310																														320																														330																													
E	R	W	T	E	R	T	M	E	A	I	D	L	R	R	V	I	S	P	T	G	E	Y	L	P	I	D	E	E	H	G	A	D	I	L	G	A	L	I	E																																																																																
E	R	W	R	E	R	I	L	D	A	I	H	T	G	L	V	T	D	S	H	G	K	E	I	K	I	T	E	E	N	G	T	N	V	I	G	A	L	I	E																																																																																
F	R	W	R	E	R	I	L	D	A	I	D	S	G	Y	I	D	N	E	G	H	Q	V	K	L	D	I	V	D	G	I	N	V	L	G	A	L	I	E																																																																																	
340																														350																														360																														370																													
S	S	Y	E	S	K	N	R	G	Y	Y	G	S	L	H	N	W	G	H	V	M	-	A	Y	I	H	D	P	D	-	G	R	F	R	E	N	P	G	V																																																																																	
S	S	H	D	S	V	N	K	P	Y	Y	G	T	L	H	N	W	G	H	V	M	-	A	R	I	H	D	A	D	-	G	R	Y	R	T	N	P	G	V																																																																																	
S	S	F	E	T	K	N	K	L	Y	Y	G	S	L	H	N	W	G	H	V	M	-	A	R	L	Q	D	P	D	-	H	R	F	R	E	N	P	G	V																																																																																	
380																														390																														400																														410																													
M	T	D	T	A	T	S	L	R	D	P	L	F	Y	R	Y	H	R	F	I	D	N	V	F	Q	E	Y	K	-	K	T	L	P	S	V	T	S	K	D	N	L																																																																															
M	D	D	T	S	T	S	L	R	D	P	I	F	Y	R	Y	H	R	F	W	M	D	N	I	F	Q	E	Y	K	-	H	E	L	P	S	Y	T	H	Q	Q	L																																																																															
M	S	D	T	S	T	S	L	R	D	P	I	F	Y	R	Y	H	R	F	I	D	N	I	F	Q	K	Y	I	-	A	T	L	P	S	Y	T	P	E	D	L																																																																																
420																														430																														440																														450																													
D	F	P	Q	V	T	I	T	D	V	K	V	K	A	K	I	P	-	-	-	N	V	V	H	T	F	L	R	E	D	E	L	E	L	-	S	H	C	L	H																																																																																
D	F	P	Q	V	R	I	S	R	V	T	V	R	S	K	V	P	-	-	-	N	I	L	H	T	F	S	K	D	S	L	E	L	-	S	H	C	L	H																																																																																	
T	C	P	G	V	H	V	N	V	T	V	N	A	K	V	P	-	-	-	-	N	V	V	T	T	F	M	K	E	A	E	L	E	L	-	S	Y	G	I	D																																																																																
460																														470																														480																														490																													
F	K	L	Y	I	Q	V	D	S	F	Y	H	L	D	H	E	S	F	S	Y	I	L	S	A	Q	N	N	S	N	A	D	K	Q	A	T	V	R	I	F																																																																																	
T	K	G	H	I	Q	V	K	Y	N	Y	E	H	L	D	H	E	P	Y	N	Y	E	I	E	V	D	N	R	T	G	E	A	R	E	T	C	V	R	I	F																																																																																
F	G	S	D	H	S	V	K	V	L	Y	R	H	L	D	H	E	P	F	T	Y	N	I	S	V	E	N	S	G	G	A	K	D	V	T	M	R	I	F																																																																																	
500																														510																														520																														530																													
L	A	P	T	Y	D	E	L	G	N	D	L	S	L	D	E	Q	R	R	L	Y	I	E	M	D	K	F	Y	H	T	I	R	P	G	K	N	T	L	V	R																																																																																
L	A	P	K	Y	D	E	L	G	N	R	L	L	L	E	E	Q	R	R	L	Y	I	E	L	D	K	F	H	R	R	L	E	P	G	K	N	V	L	V	R																																																																																
L	G	P	K	Y	D	E	L	G	N	R	L	Q	P	E	E	Q	R	R	L	N	I	E	L	D	K	F	K	A	T	L	D	P	G	K	N	V	L	V	R																																																																																
540																														550																														560																														570																													
S	S	T	D	S	S	V	T	L	S	S	V	T	V	K	E	L	R	G	E	D	L	V	E	G	Q	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	E	F	C	S																																																																																
A	S	G	D	S	S	V	T	L	S	K	V	P	T	F	E	E	L	E	S	G	N	A	N	V	N	P	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	E	Y	C	S																																																																															
D	H	R	N	S	T	V	T	I	V	E	Q	S	V	P	V	K	K	L	R	E	E	G	V	A	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	E	Y	C	S																																																																														
580																														590																														600																														610																													
C	G	K	P	Q	H	L	T	V	P	R	G	N	E	K	G	M	Q	F	E	L	F	V	M	L	T	D	A	S	V	D	R	V	Q	S	G	D	G	T	P																																																																																
D	G	K	P	E	H	M	L	V	P	R	G	K	E	R	G	M	D	F	Y	L	F	V	M	L	T	D	Y	E	E	D	S	V	Q	G	A	G	E	Q	T																																																																																
C	G	W	P	E	H	M	L	I	P	K	G	N	H	R	G	M	D	F	E	L	F	V	I	V	T	D	Y	A	Q	D	A	V	N	G	H	G	E	N	A																																																																																
620																														630																														640																																																											
V	C	A	D	A	L	S	Y	C	G	V	L	D	Q	K	Y	P	D	K	R	A	M	G	Y	P	F	D	R	K	I	T	A	...	...	...	...	...	...	COOH																																																																																	
I	D	Q	D	A	V	S	Y	C	G	A	K	D	Q	K	Y	P	D	K	K	A	M	G	Y	P	F	D	R	P	V	I	Q	V	...	...	...	...	...	...	COOH																																																																																
E	C	V	D	A	V	S	Y	C	G	A	K	D	Q	K	Y	P	D	K	K	P	M	G	F	P	F	D	R	V	I	E	G	...	...	...	...	...	...	COOH																																																																																	

niefiltern. Zwei Kolonien (p645 und p580), die auf Doppel-Filtern mit pH4-cDNA unter mäßig stringenten Waschbedingungen (45 °C, 2 x SSC, 0.1 % SDS) positive Hybridisierungssignale hervorgerufen hatten, wurden einschließlich Sequenzanalyse charakterisiert. Die ermittelten Sequenzen zeigten jedoch keine Homologien mit den bislang bekannten Aminosäuresequenzen von Hämocyanin-Untereinheiten. Eine Restriktionskarte von Klon p580 und die Sequenzen der in Deletionsmutanten charakterisierten Bereiche befinden sich im Anhang der Arbeit. Auf Klon p645 wird im Rahmen dieser Arbeit nicht näher eingegangen. Wie Teilsequenzen dieses Klons nach "Shotgun-Klonierung" der ca. 2.7 kb langen cDNA in M13-Phagen (MESSING, 1983) verdeutlichten, fanden sich auch in dieser cDNA absolut keine, annähernd homologen Sequenzabschnitte zu charakteristischen Hämocyanin-Aminosäure-Abschnitten ("Kupfer A"/"Kupfer-B"-Zentrum usw.).

So scheint weiterhin das Screening von cDNA-Klonen mit spezifischen Oligonukleotidproben die am besten geeignete Methode, um die cDNAs aufzufinden, die für die übrigen sechs Hämocyanin-Untereinheiten von *Eurypelma californicum* Hämocyanin codieren. Vorversuche dazu werden im nächsten, abschließenden Kapitel der Ergebnisse noch dargestellt.

5. Screening von cDNA-Klonen mit "Kupfer B"- Oligonukleotidprobe

Neben dem "Kupfer A"-Sauerstoffbindungsort ist auch die zweite, sauerstoffbindende Region der Hämocyanin-Polypeptidketten stark konserviert. Die Sequenz dieser "Kupfer B"-Bindungsregion lautet:

-Leucin-Histidin-Asparagin-Tryptophan-Glycin-Histidin-Valin-
Sie ist, wie dies auch für das "Kupfer A"-Zentrum gilt, bei allen bislang untersuchten Cheliceraten-Hämocyanin-Untereinheiten identisch (Abb. 34). Diese Aminosäuresequenz diente wiederum als Vorlage für die Herstellung eines synthetischen

17 mer-Oligonukleotides als Hybridisierungsprobe. Die synthetische Oligonukleotidprobe wurde, wie Abb. 34 zeigt, so gewählt, daß sie die Nukleotidsequenz des Gegenstranges der mRNA für die Aminosäuren H-N-W-G-H-V enthält. Zur Reduzierung der Heterogenität des Probengemisches wurde die dritte Base der terminalen Aminosäure Valin weggelassen. Hinsichtlich der Heterogenität der Oligonukleotidprobe - aufgrund der Codonvariabilität setzt sich das Gemisch aus 32 verschiedenen Oligonukleotiden zusammen - scheint die "Kupfer B"-Region zwar weniger geeignet zu sein, als das "Kupfer A"-Zentrum. Die "Kupfer B"-Region liegt jedoch weiter in Richtung des carboxyterminalen Endes des Proteins und dürfte daher in cDNAs, die über Oligo(dT)-Priming synthetisiert wurden, häufiger vertreten sein, als das mehr aminoterminal gelegene "Kupfer A"-Sauerstoffbindungszentrum.

In vorläufigen Versuchen wurden die cDNA-Koloniefilter A, B, C und D der Genbank IV, sowie 1000 cDNA-Klone der Genbank III mit γ -³²P markiertem "Kupfer B"-Oligonukleotidgemisch hybridisiert. Die für die "Kupfer B"-Oligonukleotid-Probe geltenden Hybridisierungs- und Waschttemperaturen sind in Tabelle 10 angegeben.

Unter den getesteten Kolonien hybridisierte ein Klon des Koloniefilters "C" mit dem Oligonukleotid (Abb. 35). Dieser Klon wurde über weitere Kolonie-Hybridisierungen nachgereinigt und als cDNA-Klon pHCC79 bezeichnet. Die Hybridisierung von pHCC79 cDNA mit "Kupfer B"-Oligonukleotidprobe wurde ferner nach Southern-Blotting der isolierten Plasmid-DNA bestätigt (Abb. 36). pHCC79-cDNA hybridisiert nicht mit Hämocyanin-Untereinheit e spezifischer cDNA-Hybridisierungsprobe pHC4. Die cDNA dieses neuen Hämocyanin-Klons ist etwa 600 bp lang. Eine Sequenzanalyse fand bislang nicht statt.

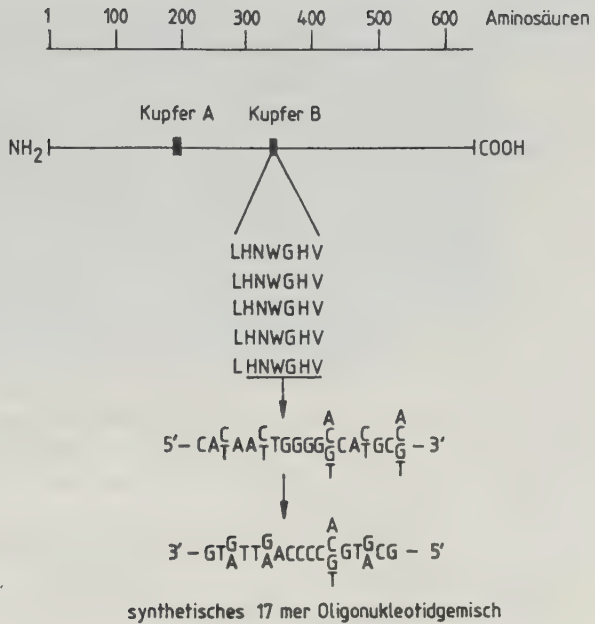


Abb. 34: Synthetische 17-mer "Kupfer B"-Oligonukleotidprobe.

Die Oligonukleotidsequenz wurde der bei Cheliceraten-Hämocyanin-Untereinheiten stark konservierten Aminosäuresequenz His-Asn-Trp-Gly-His-Val entnommen. Zur Abdeckung der Codonvariabilitäten werden 32 unterschiedliche Oligonukleotide benötigt.

Zusammensetzung des gemischten Oligonukleotides:		5' $\begin{matrix} & A & \\ & G^A T^G C^C C C C A^G T^G T^G & \\ & A & \\ & T & \end{matrix}$ 3'
Minimale Anzahl an GC-Resten:	8	} $T_D \text{ min} = 50^\circ \text{C}$
Maximale Anzahl an AT-Resten:	9	
Minimale Anzahl an AT-Resten:	5	} $T_D \text{ min} = 58^\circ \text{C}$
Maximale Anzahl an GC-Resten:	12	

Tabelle 10: "Kupfer B"-Oligonukleotidprobe.

Berechnung der Waschtemperaturen nach Hybridisierung aufgrund der Nukleotidzusammensetzung der gemischten Oligonukleotidprobe.



Abb. 35: Hybridisierung von Eurypelma cDNA-Genbank IV mit $\gamma^{32}\text{P}$ -end-markiertem 17 mer "Kupfer B"-Oligonukleotidgemisch.

Ein Klon von Filter C (Pfeil) zeigte ein positives Hybridisierungssignal auf den Doppelfiltern.

Hybridisierung: 6 x SSC, 0.5 % SDS, 0.1 mg/ml denaturierte Lachs-DNA, 5 x Denhardt's, 2 x 10⁶ cpm/ml radioaktive Probe.

Hybridisierungstemperatur: 42 °C, über Nacht.

Waschen: 6 x SSC, 0.1 % SDS; 2 x 15 min bei RT, 1 x 4 min bei 50 °C.

Exposition: 12 Stunden mit KODAK X-OMAT AR Film und Verstärkerfolie bei -70 °C.

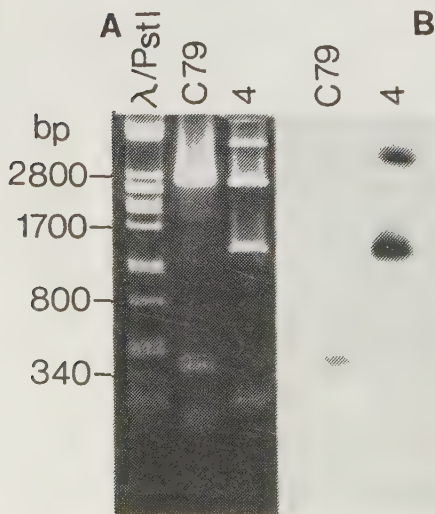


Abb. 36: Hybridisierung der cDNAs der Klone pHCC79 und pHCC4 mit "Kupfer B"-Oligonukleotidprobe.

Plasmid-DNA der Klone pHCC79 und pHCC4 wurde mit Pst I restringiert, elektrophoretisch in 1.2 %igen Agarosegelen getrennt und auf Nitrocellulose-Filter transferiert. Der Southern-Blot wurde mit $\gamma^{32}\text{P}$ -markiertem "Kupfer B"-Oligonukleotidgemisch hybridisiert.

Hybridisierungs- und Waschbedingungen: siehe Legende zu Abb. 35.

A: Agarosegel, mit Ethidiumbromid gefärbt.

B: Autoradiogramm des Southern-Blots.

VI. Zusammenfassende Darstellungen zu den Ergebnissen der Klonierung und Sequenzierung von Hämocyanin-cDNA

Abb. 37: Nukleotid-Sequenz des Hämocyanins aus *Eurypelma californicum* (Untereinheit e), wie sie aufgrund der Sequenzierung der cDNA-Klone pHc4, pHc393 sowie der partiellen Sequenzierung der Klone pHc450 und pHcC5 ermittelt wurde. Für den aminoterminalen Bereich der Kette e wurde bislang keine entsprechende cDNA gefunden. Die von der cDNA-Sequenz abgeleiteten Aminosäuren sind in Fettdruck dargestellt, Unterschiede zur proteinchemisch bestimmten Aminosäuresequenz sind mit (★) markiert und die Sequenzbereiche der "Kupfer A"- und "Kupfer B"-Region schattiert.

[illegible]

CAG ATG TGT GCG AGG TAC GAC TGC GAG CGT CTG TCA AAT GGA ATG CGC AGG ATG ATT CCT	441
Q M C A R Y D C E R L S N G M R R M I P	
210	220
TTC TCC AAT TTC GAT GAA AAG TTG GAA GGA TAT TCA GCC CAT TTG ACA TCC TTA GTC AGT	501
F S N F D E K L E G Y S A H L T S L V S	
230	240
GGT CTA CCA TAT GCT TTC CGT CCT GAT GGT CTT TGC TTG CAC GAT CTG AAA GAC ATA GAC	561
G L P Y A F R P D G L C L H D L K D I D	
250	260
CTG AAA GAG ATG TTC CGA TGG AGG GAG AGA ATC CTT GAT GCA ATT GAC TCA GGT TAC TAC	621
L K E M F R W R E R I L D A I D S G Y Y	
270	280
ATT GAC AAC GAA GGT CAC CAG GTA AAG CTC GAC ATC GTT GAT GGA ATT AAT GTC CTG GGT	681
I D N E G H Q V K L D I V D G I N V L G	
290	300
<u>Hind III</u>	
GCT CTC ATT GAA TCA AGC TTC GAA ACA AAG AAC AAG CTG TAC TAC GGT AGT CTT CAC AAG	741
A L I E S S F E T K N K L Y Y G S L H N	
310	320
TGG GCC CAT GTA ATG --- ATG GCC AGA TTG CAA GAC CCT GAT CAC AGA TTC AAT GAA AAC	798
W G H V M K M A R L Q D P D H R F N E N	
330	340
CCA GGA GTC ATG AGC GAT ACC TCT ACT TCC TTG CGT GAT CCA ATC TTC TAC AGA TAT CAC	858
P G V M S D T S T S L R D P I F Y R Y H	
350	360
AGA TTC ATC GAC AAT ATC TTC CAG AAA TAC ATA GCC ACT TTG CCT CAT TAC ACT CCA GAA	918
R F I D N I F Q K Y I A T L P H Y T P E	
370	380
GAT TTG ACA TGT CCA GGA GTT CAC GTA GTC AAC GTA ACA GTG AAT GCC AAG GTT CCA AAT	978
D L T C P G V H V V N V T V N A K V P N	
390	400
GTG GTA ACA ACT TTC ATG AAG GAA GCT GAA CTG GAA CTC TCA TAT GGC ATC GAC TTC GGA	1038
V V T T F M K E A E L E L S Y G I D F G	
410	420
ACT GAC CAT TCT GTG AAG GTA CTG TAC CGC CAC TTG GAT CAC GAA CCC TTC ACT TAC AAC	1098
S D H S V K V L Y R H L D H E P F T Y N	
430	440

ATC AGC GTC GAG AAC TCA TCT GGT GGT GCT AAG GAC GTG ACA ATG CGT ATT TTC CTC GGC	1161
I S V E N S S G G A K D V T M R I F L G	450 460
CCT AAG TAT GAC GAA TTG GGC AAC CGT CTG CAA CCA GAA CAG CAG AGG ACC CTG AAC ATC	1221
P K Y D E L G N R L Q P E Q Q R T L N I	470 480
GAA CTG GAC AAG TTC AAG GCC ACT CTC GAC CCT GGT AAG AAC GTC GTC ACA CGT GAC CAC	1281
E L D K F K A T L D P G K N V V T R D H	490 500
CGT AAT TCA ACT GTA ACT GTT GAA CAA AGC GTC CCA GTA AAG AAA CTG CGT GAG GAA GGA	1341
R N S T V T V E Q S V P V K K L R E E G	510 520
<u>Pst I Pvu II</u>	
GGC GTT GCT GGA GAA TAC TGC AGC TGC GGA TGG CCT GAA CAC ATG CTC ATC CCC AAA GGA	1401
G V A G E Y C S C G W P E H M L I P K G	* 530 * 540
AAC CAC AGG GGC ATG GAC TTC GAA CTC TTC GTC ATT GTA ACA GAC TAC GCT CAG GAT GCT	1561
N H R G M D F E L F V I V T D Y A Q D A	550 560
GTC AAC GGA CAC GGA GAA AAT GCC GAA TGT GTG GAT GCT GTG AGC TAC TGC GGA GCC AAG	1921
V N G H G E N A E C V D A V S Y C G A K	* * * 570 580
GAC CAG AAG TAT CCT GAC AAG AAG CCC ATG GGA TTC CCA TTC GAT AGA GTC ATC GAA GGA	1578
D Q K Y P D K K P M G F P F D R V I E G	590 600
TTG ACC CTT GAA GAA TTT CTA ACT CCG AGC ATG AGC TGC ACT GAT GTC AGG ATT AAG TAC	1538
L T L E E F L T P S M S C T D V R I K Y	* * 610 620
1653	
ACC GAT ATC AAA TAG ACACAGAAATCACTGAAGAAAGGATAAAAAACAAAAGACCTTCTAAATTATCTCAAACT	1711
T D I K Stop	624
TTGCAGCAGCCTTCGCATACCTTTCAAAAAATTAACGGAAGTCTTTTACCTTGCCGCAGCATATCAAAACAAACGAA	1790
AATGTTTCATCAGTCAGAATGTAAAACTTTTAAAAATTTCTAACACTGGCCTTTTTTGTATACTAACACCCAATAGTT	1869
GTACAGATTTGTCTATGTTTATGTACTTGGAAATATTGTTTTACGAAGTGAAATAAAAAAGTATTCGACAG(A)	1937
Polyadenylierungssignal	
Poly(A)-Schwanz	

(1954)

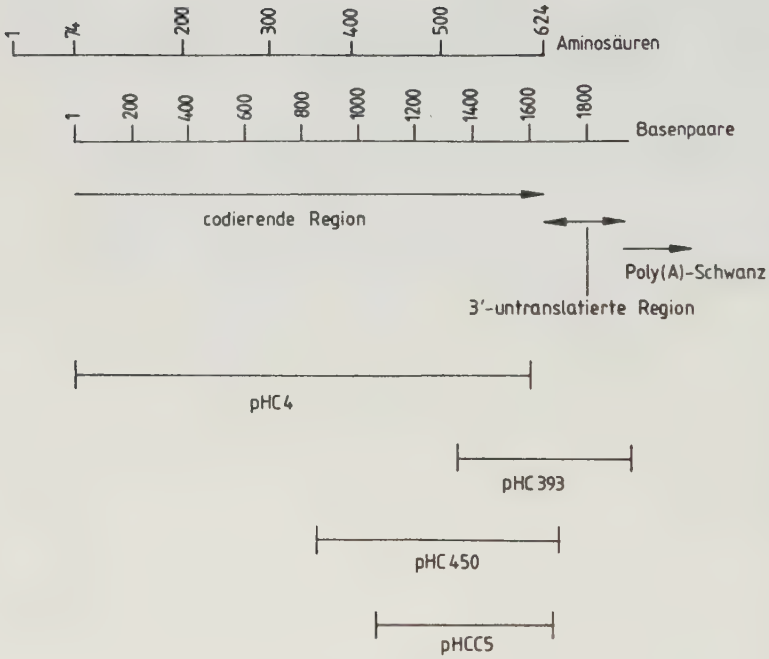


Abb. 38: Orientierung und Länge von charakterisierten cDNA-Klonen, die für *Eurypelma californicum* Hämocyanin Untereinheit e codieren.

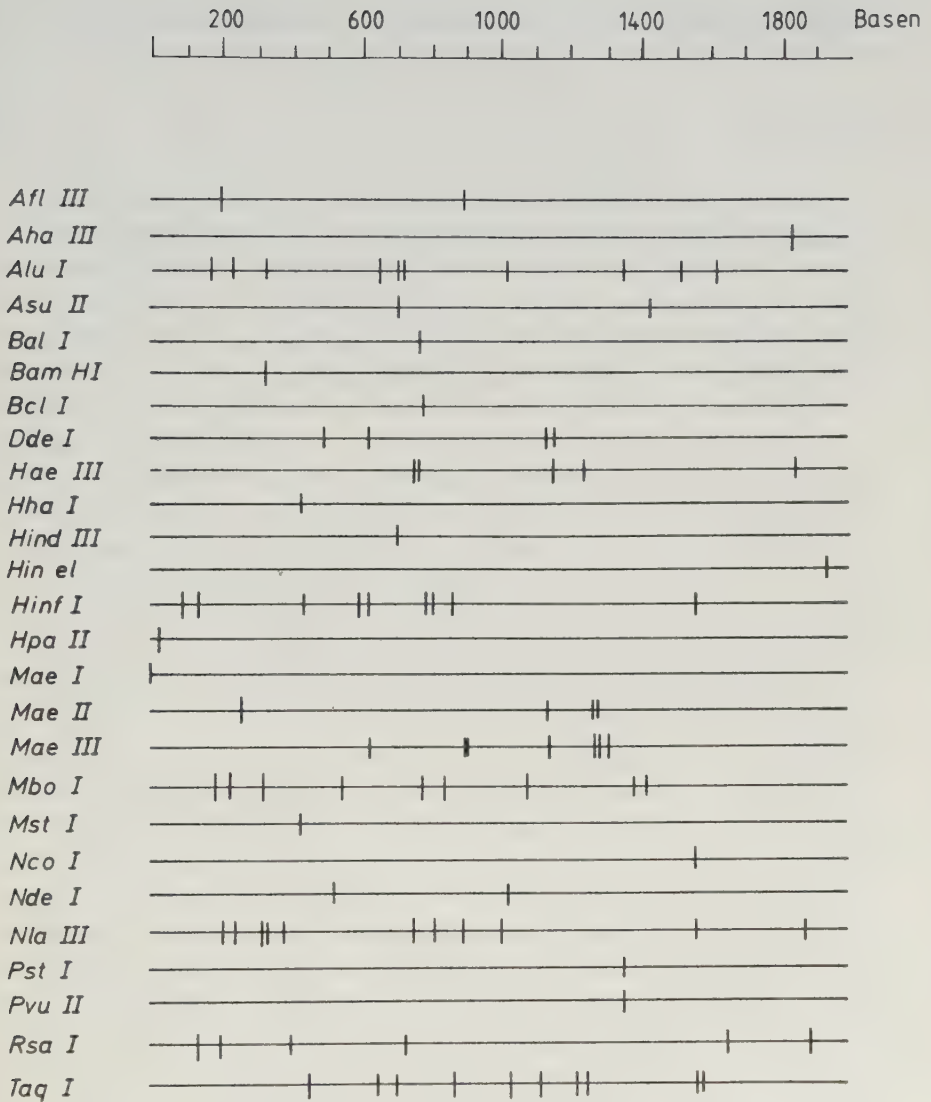


Abb. 39: Restriktionskarte für Hämocyanin-cDNA der Untereinheit e, für den Bereich, der in dieser Arbeit charakterisiert wurde.

D. DISKUSSION

Während verschiedene Hämocyane sowohl des Arthropoden- als auch des Molluskentyps hinsichtlich der Molekülstruktur teils sehr eingehend unter biophysikalischen wie biochemischen Aspekten untersucht wurden, ist über die genetischen Strukturen, die für die Synthese dieser Gruppe von Sauerstofftransportproteinen verantwortlich sind, bislang fast nichts bekannt.

Grundgedanke dieser Arbeit war, durch Konstruktion und Charakterisierung von cDNA-Klonen einen neuen experimentellen Zugang zur Erforschung der Hämocyane zu erhalten. Damit sollte es möglich werden, zum einen schneller, und ergänzend zu etablierten proteinchemischen Methoden, die Primärstrukturen aller Untereinheiten des Vogelspinnenhämocyanins zu entschlüsseln. Zum anderen erweist sich eine klonierte cDNA als sehr geeignete Sonde, um homologe Strukturen im Genom zu finden. Bis dato gibt es lediglich einen Bericht über die Klonierung von cDNA aus dem Pfeilschwanzkrebs *Limulus polyphemus* (WOOD and DIXON, 1985). Die Autoren berichten jedoch nur über die Klonierung und Hybridisierung von cDNA, nicht aber über deren Analyse und Charakterisierung.

Bei der Charakterisierung von Hämocyanin-mRNA aus *E. californicum* und Hämocyanin-cDNA konnte aufgrund der bekannten Aminosäuresequenzen (SCHARTAU et al., 1983, 1986; SCHNEIDER et al., 1983; LINZEN et al., 1985) und der Verfügbarkeit von spezifischem Antiserum (LAMY et al., 1979) der gängige Weg (immunologische Charakterisierung; Sequenzvergleich von DNA und Protein) gewählt werden. Sehr hilfreich war ferner die Kenntnis des Biosyntheseortes von Hämocyanin bei dieser Vogelspinnenart, der in histologischen Arbeiten von KEMPTER (1983) identifiziert worden war.

1. Der Biosyntheseort von Hämocyanin bei der Vogelspinne *Eurypelma californicum*

Der erste Teil der vorliegenden Arbeit befaßte sich mit der Charakterisierung von Hämocyanin-mRNA durch in vitro-Translation von mRNA aus dem Herzgewebe der Vogelspinne *E. californicum*.

In vitro-Translation stellt ein Routine-Testsystem dar, mit dem sowohl die biologische Integrität präparierter mRNA als auch die biologischen Aktivitätsmuster von Geweben ermittelt werden können. Unter den verschiedenen Systemen zur Proteinbiosynthese in vitro zeichnen sich Nuklease-behandelte Kaninchenreticulocyten-Lysate besonders durch ihre hohe Empfindlichkeit gegenüber Fremd-mRNA, sowie ihre niedrigen Nuklease- und Proteaseaktivität aus (PELHAM and JACKSON, 1976; MERRICK, 1983).

Die in vitro-Translation der mRNA aus dem Vogelspinnen-Herz führte zur Synthese einer großen Anzahl verschiedener Polypeptidketten, wie die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese zeigte. In der Immunpräzipitation mit spezifischem Antiserum gegen dissoziiertes 37 S-Hämocyanin von *E. californicum* wurde eine Gruppe von Polypeptidketten mit Molekulargewichten zwischen 68 kD und 74 kD von den heterologen Antikörpern erkannt und präzipitiert. Diese Polypeptidketten zeigten in der SDS-PAGE die gleichen Wanderungseigenschaften wie authentisches, dissoziiertes *Eurypelma*-Hämocyanin. Wegen der geringen Molekulargewichtsunterschiede der Polypeptidketten der sieben Untereinheiten kann in diesem Gelsystem allerdings nur eine Auftrennung in 5-6 Banden erreicht werden (SCHARTAU et al., 1986).

Daß die Heterogenität der 7 Untereinheiten, die am Aufbau des Gesamt-moleküls beteiligt sind, durch die Expression unterschiedlicher Gene bedingt wird und nicht alleinig durch posttranslationale Modifikationen einer/mehrerer Polypeptidketten, war bereits durch proteinchemische Charakterisie-

rung und (partielle) Sequenzierung nachgewiesen worden (MARKL et al., 1979). Die Aminosäuresequenzen der sieben Untereinheiten unterscheiden sich so stark, daß immunologische Kreuzreaktionen praktisch nicht auftreten (LAMY et al., 1979). Obgleich bei in vitro-Translation im Kaninchenreticulocyten-Lysat keine sekundären Modifikationen an der Polypeptidkette vorgenommen werden, unterschied sich die antigene Reaktivität des in vitro hergestellten Hämocyanins nicht von derjenigen des nativen, dissoziierten Vogelspinnen-Hämocyanins. Falls geringe, posttranslationale Modifikationen dennoch in vivo stattfinden, so sind diese zumindest nicht mit dem verwendeten, heterologen Antiserum erkennbar. Bei den bisher proteinchemisch sequenzierten Ketten a, d und e wurden keine sekundären Modifikationen festgestellt (SCHARTAU et al., 1983, 1986; SCHNEIDER et al., 1983). DE BETHUNE et al. (1985) wiesen dagegen für einen weiteren Vertreter der Arthropoden, *Astacus leptodactylus*, nach, daß bei diesem Tier nur in *Xenopus*-Oozyten translatiertes, also posttranslational modifiziertes Hämocyanin, die gleichen antigenen Eigenschaften aufwies wie das native Molekül (siehe auch D.2.).

Der anhand der Fällung mit TCA gemessene hohe Gehalt an immunpräzipitierbarem Material unter den in vitro-Translationsprodukten deutet auf einen beachtlichen Anteil von Hämocyanin-mRNA in den Hämocyten des Herzens hin. In den hier beschriebenen Versuchen reagierten jeweils zwischen 7 und 10 % der Gesamttranslationsprodukte positiv mit dem Serum. Im folgenden Kapitel sollen nun diese Ergebnisse zunächst im Zusammenhang mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen betrachtet und die bislang identifizierten Hämocyaninbiosynthesorte bei verschiedenen Mollusken und Arthropoden verglichen werden.

2. Vergleich der Hämocyaninbiosyntheseorte verschiedener Vertreter von Arthropoden und Mollusken

Histologische Daten

Mit Ausnahme der Amphineura, Bivalvia und Chilopoda wurde in allen übrigen Klassen, in denen Hämocyanin als Sauerstofftransportprotein dient (Abb. 40), zumindest bei je einem Vertreter der Bildungsort für Hämocyanin bestimmt (Tabelle 11). Sowohl Daten aus der Ultrastrukturforschung als auch Ergebnisse aus dem Einbau von radioaktiven Aminosäuren in immunpräzipitierbares Hämocyanin in vitro in Gewebsextrakten (MESSENGER et al., 1974), weisen die paarigen Kiemendrösen der Cephalopoden als Hämocyaninbiosyntheseort aus. Die Drüsenzellen dieser Branchialdrüsen werden als hochspezialisierter Zelltyp mit biosynthetischem Charakter (ausgeprägtes ER; geringer Gehalt an Mitochondrien, Glykogen, Lysosomen) beschrieben. Sie enthalten zudem viel Kupfer (SCHIPP et al., 1973).

Ein ausgeprägtes endoplasmatisches Reticulum zeichnet auch die Porenzellen der Gastropoda aus, in denen ebenfalls elektronenmikroskopisch in den Zellen und durch in vitro-Markierung in Gewebsextrakten Hämocyanin nachweisbar war (WOOD et al., 1981). Die Porenzellen sind jedoch nicht in einem bestimmten Organ des Tieres konzentriert, sondern im Bindegewebe verteilt. So kommt es, daß bei verschiedenen Arten unterschiedliche Regionen - infolge von Agglomerationen der Porenzellen ? - an der Hämocyaninbiosynthese beteiligt sind: die Porenzellen um die Atemhöhle bei *Helix aspera* (SMINIA and VLUGT-van DAALEN, 1977), bei *Lymnaea stagnalis* die Porenzellen des Mantelgewebes. Auch die von REGER (1973) beschriebenen Interstitiellen Zellen bei *Limax spec.* sind wahrscheinlich identisch mit Porenzellen (SMINIA, 1977). Da die Porenzellen der Gastropoda bei denjenigen Vertretern der Gruppe, die Hämoglobin als Atmungsprotein benutzen, auch den

Hauptbiosyntheseort dieses Sauerstoffträgers darstellen (SMINIA, 1972), könnte die Hauptaufgabe dieses Zelltyps generell in der Bereitstellung der Atmungspigmente der Gastropoda liegen (SMINIA, 1977).

SCHMEKEL und WEISCHER (1973) fanden bei verschiedenen Vertetern der Doridoidea (Nacktkiemer/Sternschnecken) Hämocyanin als Zelleinschluß in den Zellen der Blutdrüse, eines Organs an der vorderen Aorta dieser Schnecken. Die Autoren konnten jedoch nicht klären, ob es sich bei diesen Zellen,

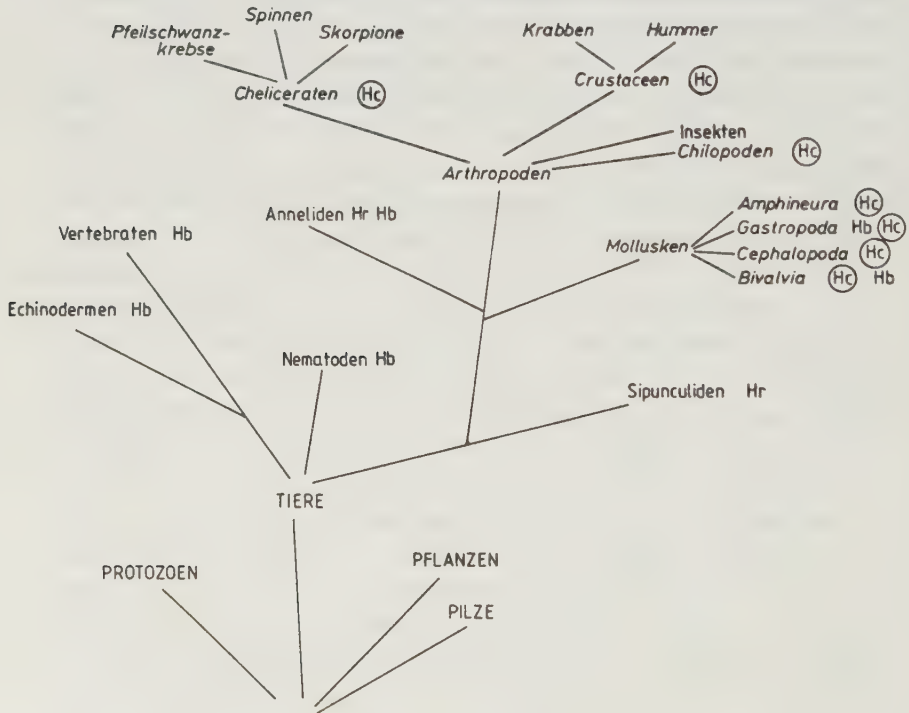


Abb. 40: Phylogenetische Verteilung des Hämocyanins (Hc) als Sauerstofftransportprotein. (Hb), Hämoglobin; (Hr), Hämerythrin; nach VAN HOLDE und MILLER (1982).

Spezies	Ort der Hämocyaninbiosynthese	Nachweis- methode	Literatur
<u>MOLLUSKEN</u>			
Sepia officinalis Loligo vulgaris Octopus vulgaris Eledone moschata	Branchialdrüse	△	SCHIPP et al., 1973.
Octopus vulgaris			
Eledone moschata			
Octopus vulgaris			
Limax sp.	Interstitielle Zellen in verschiedenen subdermalen Regionen der Körperwand	△	MESSINGER et al., 1974. REGER, 1973
Doridoidea (verschiedene Vertreter)	Blutdrüse an der vorderen Aorta (?)	△	SCHMEKEL and WEISCHER, 1973.
Lymnea stagnalis	Porenzellen	△	SMINIA and BOER, 1973.
Lymnea stagnalis	Porenzellen	■	WOOD et al., 1981.
Arion hortensis	Porenzellen	△	SKELLING and NEWELL, 1975.
Helix aspera	Porenzellen	△	SMINIA and VLUGT- van DAALEM, 1977.
<u>ARTHROPODEN</u>			
Limulus polyphemus	Cyanoblasten der Sinusoï- dalräume hinter Komplex- auge	△	FAHRENBACH, 1970
Carcinus maenas	Cyanoblasten/-cyten der Kropfwand	△▲	GHIRETTI-MAGALDI et al., 1977.
Homarus americanus	Hepatopankreas	■	SENKBEIL and WRISTON, 1981.
Squilla mantis	Retina und Subretinal- spalt	△▲	SCHOENENBERGER et al., 1980.
Eurypelma californicum	Hämocyten der Herzinnen- wand	▲■	KEMPTER, 1983.

Tab. 11: Charakterisierung der Biosyntheseorte für Hämocyanin bei verschiedenen Vertretern von Mollusken und Arthropoden aufgrund der Ultrastruktur der Zellen/Gewebe (△), Immunhistochemie (▲) oder radioaktiver in vitro-Markierung von Gewebsextrakten (■).

die ultrastrukturell weder den Porenzellen noch den Branchialdrüsenzellen ähneln, um den Synthese-, Speicher- oder Abbauort für Hämocyanin handelt.

Die bisherigen Ultrastrukturuntersuchungen der Zellen der Hämocyaninbiosynthese bei Cephalopoden und Gastropoden lassen folgendes, einheitliches Prinzip erkennen: Hämocyanin-mRNA scheint an membrangebundenen Ribosomen des endoplasmatischen Reticulums translatiert, das Hämocyanin im Lumen des ER akkumuliert und durch merokrine Sekretion freigesetzt zu werden.

Reichlich heterogen wirken demgegenüber die Daten über die Hämocyaninbiosyntheseorte bei Arthropoden. Man sucht vergeblich nach einem einheitlichen Prinzip bezüglich der Syntheseorte, vergleichbar dem der Cephalopoden/Mollusken. Die fünf in Tabelle 11 angeführten Beispiele spiegeln diese Heterogenität wieder: Intrazelluläres Hämocyanin wurde beim Pfeilschwanzkrebs (FAHRENBACH, 1970), bei der Strandkrabbe (GHIRETTI-MAGALDI et al., 1977), beim Hummer (SENKBEIL and WRISTON, 1981), dem Fangschreckenkrebs (SCHOENENBERGER et al., 1980) und der Vogelspinne (KEMPTER, 1983, 1986) jeweils in unterschiedlichen Geweben im Organismus angetroffen. Die einzige Gemeinsamkeit dieser Zellen mag sein, daß sie mesodermalen Ursprungs sind, mit zahlreichen freien Ribosomen ausgestattet sind und das im Cytoplasma akkumulierte Hämocyanin wahrscheinlich durch holokrine Sekretion an die Hämolymphe abgeben (SMINIA, 1977).

Expression von Hämocyanin-mRNA in zellfreien Systemen und Xenopus-Oozyten

In jüngerer Zeit konnten die Befunde aus Elektronenmikroskopie und Immunhistochemie größtenteils durch Translation isolierter mRNA in vitro bestätigt werden (Tab. 12). Die Ergebnisse lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

Die riesigen, homogenen Polypeptidketten (MG ca. 400 kD), die sich im nativen Hämocyanin der Mollusken zu einer zylindrischen Struktur zusammenfügen, werden jeweils von einer mRNA codiert (VANDERBEKE et al., 1981, 1982; VANDAMME et al., 1985, 1987; PREAUX et al., 1986). Eingehender wurde die Expression des Hämocyanins bei *Sepia officinalis* untersucht: VANDAMME et al. (1987) fanden die Translationsaktivität für Hämocyanin in vitro ausschließlich in der mRNA-Fraktion membrangebundenen Polysomen, die zusammen mit dem Zellkern sedimentieren. Wegen der Länge der Transkripte erwies sich die Translation in *Xenopus*-Oozyten als am geeignetsten. In diesem Zusammenhang sollte auch erwähnt werden, daß es sich bei Molluskenhämocyaninen um Glykoproteine handelt (van HOLDE and MILLER, 1982).

In Übereinstimmung mit den histologischen Befunden wurde bei Arthropoden eine spezifische Expression von Hämocyanin in verschiedenen Geweben festgestellt. Bei zwei Vertretern der Crustaceen (*Cancer pagurus*, *Astacus leptodactylus*) wurde jeweils Hämocyanin-mRNA im Hepatopankreas identifiziert. Da die primären Translationsprodukte - zumindest im Falle von *A. leptodactylus* Hämocyanin - offenbar posttranslational modifiziert werden, wurden in vitro-Translationsprodukte, die mit nativen Hämocyanin identisch waren, nur bei Translation in *Xenopus*-Oozyten erhalten.

Bei Vertretern der Merostomata (*L. polyphemus*, WOOD and BONAVENTURA, 1981; SIGGENS and WOOD, 1983), Scorpiones (*A. australis*, ALLIEL et al., 1983; *L. quinquestriatus*, AVISSAR et al., 1983) und Araneae (*E. californicum*, VOIT and SCHNEIDER, 1986 a,b) wurden die Nachweise von Hämocyanin-mRNA mittels in vitro-Translation in Kaninchenreticulocyten-Lysaten geführt. Dies läßt zunächst vermuten, daß Hämocyanine in der Klasse der Arachnida nicht posttranslational modifiziert werden, oder diese Modifikation zumindest die immunologische Reaktion mit spezifischem Antiserum nicht beeinträchtigt. In der Tat wurde der Glykoproteincharakter des Hämocyanins nicht nur bei Vertretern der Crustacea (*Panulirus*

Tab. 12: Zusammenfassung der Daten zur Translation von Hämocyanin-mRNA in zellfreien Translationssystemen und Xenopus-Oozyten.

Spezies	Größe der UE (natives Hc)	Gewebe des RNA-Isolats	Transla-tions- system	Antiserum	Immunprä- zipitate	Literatur
<u>MOLLUSKEN</u>						
<i>Sepia officinalis</i>	10 homogene UE à 390 kD	Branchial- drüse bzw. Kiemen	Xenopus- Oozyten	gegen Hc von <i>S.</i> <i>officinalis</i>	1 Polypeptid- kette mit MG= 390 kD	VANDERBEKE et al., 1982; VANDAMME et al., 1985, 1987; PREAUX et al., 1986.
<i>Loligo vulgaris</i>	10 homogene UE à 400 kD	Branchial- drüse bzw. Kiemen	Xenopus- Oozyten	gegen Hc von <i>S.</i> <i>officinalis</i>	1 Polypeptid- kette mit MG= 400 kD	VANDERBEKE et al., 1981, 1982,
<i>Lymnaea stagnalis</i>		Branchial- drüse	Kaninchenreti- culocyten-Lysat	"	-	VANDERBEKE et al., 1981.
		Mantel- gewebe	Kaninchenreti- culocyten-Lysat	gegen Hc von <i>L.</i> <i>stagnalis</i>	1 Polypeptid- kette mit MG= 300 kD	WOOD und SIGGENS, 1981.
<u>ARTHROPODEN</u>						
<i>Astacus leptodactylus</i>	4 heterogene UE à 75 kD	Hepato- pankreas, Herz, Kropfwand, Gewebe um Komplexaugen	Kaninchenreti- culocytenlysats	gegen Hc von <i>A.</i> <i>leptodac- tylus</i>	2 Polypeptid- ketten (nur bei Hepatopankreas)	de BETHUNE et al., 1985; PREAUX et al., 1986.
			Xenopus- Oozyten	"	Polypeptidket- tenmuster wie natives Hc (nur Hepatopankreas)	de BETHUNE et al., al., 1985; PREAUX et al., 1986.

Cancer pagurus	4 heterogene UE à 80-90 kD	Reticuläres Bindegewebe, Hepato- pancreas	Kaninchenreti- culocytenlysat	gegen Hc von C. pagurus	Polypeptidket- tenmuster wie natives Hc	JACOBS et al., 1984; PÉREZ et al., 1986.
Limulus polyphemus	heterogene UE à 67-72 kD	Gewebe um Komplexauge	Kaninchenreti- culocytenlysat	gegen Hc von L. polyphemus	Polypeptidket- ten à 69 kD, 70 kD, 71 kD, 71,5 kD.	WOOD and BONA- VENTURA, 1981; SIGGENS and WOOD, 1983.
		"	Xenopus- Oozyten	"	mehrere Poly- peptidketten à 68-71 kD.	SIGGENS and WOOD, 1983.
Androctonus australis	8 heterogene UE à 70-73 kD	Cuticula	Kaninchenreti- culocytenlysat	gegen Hc von A. australis	8 Polypeptidket- ten à 70-73 kD	ALLIÉL et al., 1983.
		"	"	Antikörper gegen UE 2 und 4	2 Polypeptidket- ten	"
Leiurus quinquestriatus	5 UE à 75 kD	Gesamttier	Kaninchenreti- culocytenlysat	gegen Hc von L. quinque- striatus	1 Polypeptidket- tenbande, 75 kD	AVISSAR et al. 1983.
Eurypelma californicum	7 heterogene UE à 68-74 kD	Herz	Kaninchenreti- culocytenlysat	gegen Hc von E. californ.	Polypeptidket- tenmuster wie natives Hc.	VOIT and SCHNEIDER, 1986.

interruptus, BAK et al., 1986; VAN KUIK et al., 1986; SOETER et al., 1986) nachgewiesen, sondern auch beim Skorpion *Androctonus australis* (DEBEIRE et al., 1986). Bei einer sehr sorgfältigen Untersuchung der Untereinheit e aus dem Eury-pelma-Hämocyanin sind keine Kohlenhydrate gefunden worden, die kovalent an die Polypeptidketten gebunden sind (KELLER-MANN, 1982).

Betrachtet man die Ergebnisse aus Histologie, Immunhistochemie und der Translation von Hämocyanin-mRNA in vitro, die verschiedene Arbeitsgruppen zur Ermittlung des Hämocyaninbiosyntheseortes zusammengetragen haben, so sollten folgende Erkenntnisse hervorgehoben werden:

1. Das Molluskenhämocyanin wird von riesigen mRNAs codiert und vermutlich an membrangebundenen Ribosomen der Zellen der Branchialdrüse (Cephalopoden) bzw. Porenzellen (Gastropoden) translatiert.
2. Bei Arthropoden sind die Hämocyaninbiosyntheseorte eventuell innerhalb einer Klasse (Crustaceen) konserviert, ansonsten jedoch von Vertreter zu Vertreter recht heterogen. Da die primären Translationsprodukte vermutlich nicht bei allen Vertretern posttranslational modifiziert werden, dürfte auch der intrazelluläre Translationsort (Ribosomen des ER/freie Ribosomen) innerhalb dieses Stammes nicht einheitlich sein.
3. Strategie: cDNA-Synthese, Klonierung und Identifizierung von Hämocyanin-Klonen

Aus Hybridisierungskinetiken weiß man, daß der Großteil der mRNA-Moleküle in den Zellen höherer Eukaryonten sehr heterogen ist ($1-2 \times 10^4$ verschiedene mRNA-Spezies) und nur in sehr geringer Kopienzahl (5-15 Moleküle/Zelle) vorliegt. Daneben gibt es einige hundert verschiedene mRNAs mit etwa

100-1000 Kopien/Zelle und schließlich die Gruppe weniger, stark exprimierter Gene, von denen pro Gen über 10^4 Transkripte/Zelle vorhanden sind. Wieviele Gene exprimiert werden, hängt nicht alleine vom betrachteten Organismus ab, sondern auch von Entwicklungsstadien und speziellen Zelltypen (LEWIN, 1980). Die Chance, eine spezifische cDNA in der Population von cDNA-Klonen wiederzufinden, ist jedenfalls weitaus günstiger, wenn man den Zelltyp kennt, in dem die gesuchte mRNA in hoher Kopienzahl transkribiert wird. Wie mehrmals erwähnt, codieren in Herzhämocyten von *E. californicum* (nach Proliferationsinduktion) ca. 7 % der mRNA für Hämocyanin. WOOD und BONAVENTURA (1981) untersuchten die Häufigkeit von Hämocyanin-mRNA bei *Limulus polyphemus*: Sie fanden, daß 0.25 % der Translationsprodukte von mRNA aus der Gewebsregion hinter dem Komplexauge, dem vermuteten Biosyntheseort bei diesem Tier, auch tatsächlich immunologisch als Hämocyanin nachweisbar waren. Einen extrem hohen Gehalt an Hämocyanin-mRNA von 11-13 % (*Sepia officinalis*) und 17-19 % (*Loligo vulgaris*) zeichnet die Zellen der Kiemenregion zweier Cephalopoden aus (VANDERBEKE et al., 1982).

Die ds-cDNA wurde nach einer Routine-Methode von GUBLER und HOFFMAN (1983) hergestellt, als Matrice zur Synthese diente unfractionierte RNA aus dem Herzgewebe der Vogelspinne. Die 4 verschiedenen cDNA-Genbanken waren jeweils von einem Einzeltier angelegt worden. Zweck dieses Vorgehens war, das Ausmaß der Mikroheterogenität in den Aminosäuresequenzen der Hämocyaninuntereinheiten erfassen zu können. Für die proteinchemische Bestimmung der Aminosäuresequenzen nach dem EDMAN-Abbau (SCHARTAU et al., 1983, 1986; SCHNEIDER et al., 1983) war jeweils die Hämolymphe vieler Vogelspinnen vereint worden, wobei Mikroheterogenität möglicherweise verdeckt wurde. Bei Sequenzanalysen homologer DNA-Abschnitte einer Länge von 600-1950 bp bei maximal 4 Individuen wurde indes keine Mikroheterogenität entdeckt. Es erscheint daher für die Etablierung künftiger cDNA-Genbanken sinnvoller, das Herzgewebe mehrerer Vogelspinnen zu vereinigen. Durch die

Erhöhung der verfügbaren RNA würden letztlich die einzelnen Schritte der cDNA-Synthese besser überprüfbar und damit optimierbar.

Im Hinblick auf spätere Manipulationen an der inserierten cDNA erwies sich die Klonierung in pUC19-Plasmid am praktikabelsten: Die Sequenzierung der cDNA-Enden im Plasmid ist zwar prinzipiell auch in den Vektoren pUC9 und pBR322 möglich, allerdings erforderten lange dC/dG-Schwänze der DNA oftmals zunächst die Konstruktion von Deletionsmutanten zur Beseitigung der "Tails" (dC/dG-Schwänze ab einer Länge von 15 homogenen Nukleotiden verursachten in der Regel einen Abbruch der Sequenzreaktion). cDNA in der Pst I-Stelle des Vektors pUC19 kann ohne vorherigen Umklonierungsschritt mit Exonuklease III/VII deletiert werden.

Strategie des Screening

Auf der Suche nach Hämocyanin-cDNA-Klonen wurden drei verschiedene Hybridisierungsproben eingesetzt:

1. Ein synthetisches 17-mer Oligonukleotidgemisch, dessen Sequenz von der stark konservierten Aminosäuresequenz des "Kupfer A"-Sauerstoffbindungsortes abgeleitet war.
2. Die cDNA eines Hämocyanin-Klons, der im Laufe der Arbeit mit Hilfe der "Kupfer A"-Probe identifiziert worden war.
3. Ein weiteres 17-mer Oligonukleotidgemisch, welches der Sequenz des zweiten Sauerstoffbindungscentrums, "Kupfer B", der Hämocyaninuntereinheiten entsprach.

Mit Hilfe der "Kupfer A"-Oligonukleotidprobe wurden in Genbank I ein positiver Klon (pHC4), in den Genbanken II und III jedoch keine weiteren positiven Klone gefunden. Die cDNA des Klons pHC4 hatte eine Länge von 1.62 kb. Wie die Sequenzanalyse (nach Subklonierung in dem Phagen M13) zeigte, codierte diese cDNA für 85 % der Polypeptidkette e des Hämocyanins von *E. californicum*. 24 carboxyterminal gelegene Aminosäuren, sowie 73 aminoterminal gelegene Aminosäuren

fehlten (siehe auch D.4.).

Da die Hybridisierung mit der "Kupfer A"-Oligonukleotidprobe in den Genbanken I-III zu keinem weiteren Erfolg geführt hatte, wurden die Klone mit nick-translatierter cDNA des Klons pHc4 untersucht: Unter 1000 Klonen von Genbank III waren 6 Klone hybridisierungs-positiv, auf 4 Filtern von Genbank IV (ca. 5200 Klone) hybridisierten insgesamt 10 Klone mit der radioaktiven cDNA-Probe.

10 dieser 16 positiven Klone wurden durch Restriktionskartierung genauer charakterisiert und die cDNA dreier Klone, pHc393, pHc450 und pHcC5, durch DNA-Sequenzierung analysiert. Restriktions- wie Sequenzanalyse zeigten, daß die cDNAs dieser neu gefundenen Klone ausschließlich 3'-terminale codierende und untranslatierte Bereiche repräsentierten. Einer der neu charakterisierten Klone, pHc393, enthielt die Nukleotidsequenz der gesamten 3' -untranslatierten Region. Erwähnenswert ist, daß mit der für Hc-Untereinheit e codierenden cDNA-Probe wiederum ganz spezifisch Hämocyanin-cDNA-Klone der Untereinheit e und keiner anderen Untereinheit gefunden wurden.

Die Genbanken II-IV sind zwar umfangreicher als Genbank I sie scheinen jedoch vornehmlich die Hc-cDNAs für die carboxyterminalen Domänen dieser Proteine zu enthalten. Der Grund dafür mag im Zusammenhang mit der Qualität der verwendeten reversen Transkriptase stehen, wie im Ergebnisteil diskutiert.

Überlegungen zur künftigen Strategie

Obwohl die "Kupfer A"-Oligonukleotidprobe wegen der geringen Heterogenität des Probengemisches sicherlich eine sehr geeignete Hybridisierungsprobe zum Screening von cDNA-Genbanken - selektiv zum Auffinden sehr langer Hämocyanin-cDNA-Transkripte - darstellt, sollten bei nachfolgenden Arbeiten zusätzliche Hybridisierungssonden eingesetzt werden.

Im Rahmen von Vorversuchen hierzu wurden ca. 4000 Klone von Genbank IV, sowie 1000 Klone von Genbank III mit einer der "Kupfer B"-Sauerstoffbindungsstelle des Hämocyanins (H-N-W-G-H-V) entsprechenden Oligonukleotidprobe durchsucht. Es wurde ein positiver cDNA-Klon (pHCC79) gefunden. Zwar wird zur Abdeckung der Codonvariabilität der Sequenz H-N-W-G-H-V ein Gemisch aus 32 verschiedenen Oligonukleotiden benötigt (die dritte Base von Valin wurde weggelassen), die "Kupfer B"-Sequenz liegt jedoch fast zentral in der Polypeptidkette der einzelnen Untereinheiten (Kette e: Pos. 319-324 Gesamtlänge Kette e: 624 Aminosäuren). Somit lassen sich mit dieser Probe aus einer ebenfalls hoch konservierten Proteinregion auch etwas kürzere cDNAs finden, die mit der "Kupfer A"-Probe nicht mehr hybridisieren. Aufgrund fehlender Kreuzhybridisierungen von cDNA pHCC79 mit nick-translatierter cDNA-Probe für Untereinheit e (pHC4) kann davon ausgegangen werden, daß dieser Klon für eine weitere Hämocyanin-Untereinheit codiert. Eine Sequenzanalyse der cDNA steht noch aus.

Parallel hierzu führte der Versuch, nicht mit Hilfe von Sonden für stark konservierte Sequenzabschnitte, sondern im Gegenteil für Untereinheiten-spezifische Sequenzen die cDNAs zu finden, zu einem ersten Erfolg: Eine für Untereinheit b des Vogelspinnenhämocyanins charakteristische Sequenz (D-Q-T-D-Y; Pos. 561-565) wurde für die Synthese einer UE-b-spezifischen Oligonukleotidprobe ausgewählt. Die Aminosäuresequenz der Untereinheit b ist partiell nach biochemischen Methoden (EDMAN-Abbau) entschlüsselt (SCHARTAU et al., 1986; SONNER, pers. Mitt.). Beim Screening einiger Kolonien-Filter der Genbank IV hybridisierte ein cDNA-Klon mit dem "b"-Oligonukleotid. Die nachfolgende Sequenzanalyse bestätigte, daß die cDNA des positiven Klons auch tatsächlich für die Untereinheit b von *E. californicum* Hämocyanin codierte (SONNER, pers. Mitt.).

Nach den bisherigen Analysen von cDNAs aus Genbank IV ist es eher unwahrscheinlich, daß ein cDNA-Klon, der die gesam-

te, etwa 2300 bp lange cDNA-Sequenz, die der Länge einer mRNA einer Hämocyanin-UE entspräche, enthält, in dieser Genbank gefunden wird. Deshalb dürfte es notwendig sein, weitere cDNA-Genbanken zu etablieren, die z. B. durch Verwendung Hämocyaninsequenz-spezifischer Primer zur cDNA-Erststrang-Synthese hauptsächlich 5'-terminale Bereiche der mRNA-Region enthalten.

Vergleich mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen

Bislang wurde in drei Arbeitsgruppen die Idee aufgegriffen, aus der spezifischen Aminosäurefolge des "Kupfer A"-Zentrums eine Oligonukleotidprobe zur Charakterisierung von Hämocyanin-DNA-Sequenzen abzuleiten. WOOD und DIXON (1985) berichteten über die cDNA-Klonierung von mRNA aus dem Pfeilschwanzkrebs *Limulus polyphemus*. Die etablierte cDNA-Bank enthielt etwa 750 Klone. Von diesen hybridisierten einige mit einer 18-mer Oligonukleotidprobe des "Kupfer A"-Zentrums (HHWHWH). Eine eingehendere Charakterisierung der cDNA dieser Klone steht noch aus.

Zur Identifizierung von Hämocyanin-mRNA wurde von AVISSAR et al. (1986 a,b) ebenfalls das 18-mer Oligonukleotid der Aminosäuresequenz HHWHWH verwendet. Die Autoren isolierten mRNA aus dem Skorpion *Leiurus quinquestriatus* und fanden aufgrund von Northern-Blot-Analysen eine mRNA-Spezies einer Länge von 2.3 kb, die mit der radioaktiven Oligonukleotidprobe hybridisierte. Eine ähnliche mRNA-Größe ermittelte auch ich für Vogelspinnen-Hämocyanin-mRNA. Erstaunlich hingegen ist der Befund der Autoren, daß die für Hämocyanine aus Cheliceraten spezifische Oligonukleotidprobe auch mit mRNA zweier Mollusken, *Levantina hierosolima* (Gastropoda) und *Sepia officinalis* (Cephalopoda), hybridisierte. Die hybridisierenden mRNA-Banden hatten eine Länge von 9.4 kb, 6.7 kb, 4.0 kb und 1.7 kb (*Levantina*), bzw. 9.5 kb, 2.8 kb und 1.7 kb (*Sepia*). AVISSAR et al. (1986 a,b) leiten aus

diesem Ergebnis ab, daß die großen mRNA-Spezies (9.5 kb/ 9.4 kb) authentische Hämocyanin-mRNAs für die riesigen Polypeptidketten der Molluskenhämocyanine darstellen, während die kürzeren, hybridisierenden RNAs als Spaltprodukte dieser kompletten mRNAs zu interpretieren seien, die jeweils eine/ mehrere funktionelle Domänen (MG ca. 50-55 kD) der Molluskenhämocyanine codieren. Für diesen Fall wären alternative Splicing-Prozesse zu fordern, die aus einer Transkriptionseinheit verschiedene mRNAs hervorgehen liessen. Differentielles Splicing wurde bei Eukaryonten mehrfach festgestellt (z. B. Huhn-Myosin-Gen, NABESHIMA et al., 1984; Calcitonin-Gen, AMARA et al., 1982; Review: BREITBART et al., 1987). Andererseits wurde bei der ersten, kompletten Aminosäuresequenzbestimmung einer funktionellen Domäne eines Molluskenhämocyanins aus *Helix pomatia* (DREXEL et al., 1987) keine Kupferbindungsstelle des "A"-Typs (HHWHWH) gefunden. Die Sequenz mit den Kupferbindungsliganden lautet "LHNALH" (Kupfer B-Typ). So bleibt bezüglich der Versuche von AVISSAR et al. (1986 a,b) die Frage offen, ob andere funktionelle Domänen des Molluskenhämocyanins tatsächlich den "Kupfer A"-Bindungstyp enthalten und welche biologische Bedeutung hinter der Translation funktioneller Domänen stünde. Die Translation von Hämocyanin-mRNA aus *Sepia officinalis* führte stets zu einheitlichen, immunpräzipitierbaren Translationsprodukten von 390 kD (VANDERBEKE et al., 1982; VANDAMME et al. 1985, 1987). Ergänzend sei noch erwähnt, daß die Autoren die Hybridisierungen des 18-mer Oligonukleotides ($\begin{smallmatrix} \text{A} & & \text{A} & & \text{A} & & \text{A} \\ & \text{G} & \text{TG} & \text{CC} & \text{A} & \text{G} & \text{TG} & \text{A} \\ & & & & & & & \text{G} \end{smallmatrix}$) bei relativ geringer Stringenz (T_D 46.5 °C für *Leirus*-mRNA; T_D 44.5 °C für *Levantina*-mRNA) durchführten.

4. Vergleich der cDNA- und Proteinsequenz der Untereinheit e des Hämocyanins von *Eurypelma californicum*

Durch die Sequenzierung der cDNA-Klone pHc4 und pHc393 konnten 88 % der für die Untereinheit e von *E. californicum* Hämocyanin codierenden Nukleotidsequenz ermittelt werden. In keinem der untersuchten Klone befanden sich die Transkripte der 5'-terminalen Bereiche von Hc-e-mRNA. Deshalb steht die Nukleotidsequenz für 73 Aminosäuren der aminoterminalen Region von Kette e noch aus. Die Aminosäuresequenz von Kette e die auf proteinchemischem Weg teils manuell (CHANG et al., 1978), teils automatisch (EDMAN and HENSCHEN, 1975) bestimmt worden war (SCHNEIDER et al., 1983) und die in dieser Arbeit über cDNA-Analyse ermittelte Sequenz, zeigen eine große Übereinstimmung (Abb. 41): Innerhalb der 551 vergleichbaren Aminosäurepositionen gibt es lediglich an 15 Stellen unterschiedliche Bestimmungen (= 2.7 %). In Abb. 42 sind die differierenden Positionen zusammengefaßt. Drei der Unterschiede konnten einfach durch Übertragungsfehler erklärt werden (Pos. 90/110/216), weitere Unterschiede mögen teils auf nicht eindeutige Identifizierung der Aminosäure-Phenylthiohydantoine zurückzuführen sein.

In der cDNA für *Eurypelma* Hc-e befanden sich an zwei Positionen der Kette die Codons für Arginin anstelle derer für Lysin (Pos. 79/159). Der Histidinrest in Pos. 307 war durch Phenylalanin ersetzt, was das bei der proteinchemischen Aufarbeitung erhaltene, chymotryptische Spaltprodukt 42-CH6 (Spaltung zwischen den Pos. 307/308, SCHNEIDER et al., 1983) erklären könnte. In Pos. 254 steht in der cDNA Histidin statt Methionin; dies ist vermutlich wiederum die Erklärung dafür, daß das Bromcyanpeptid CB8/9 nicht erwartungsgemäß in Form von zwei Bruchstücken auftrat (SCHNEIDER et al., 1983).

In einer Region hoher Aminosäuresequenzhomologien innerhalb der Arthropoden-Hämocyanine wurde anstelle von Aspara-

³⁰
 NH₂ PDKQKQLRVISLFEHMTSINTPLPRDQIRARLHHLGRLPQ
⁶⁰
 GELFSDFFHEEDLEEATELYKILYTAKDFDEVINLAKQS[K]T
 LAKQS[R]T
⁹⁰
 FVNEGLFVY[H]VSVALLRDDCKGIVVPAI[-]EIFPDRFVPT¹²⁰
 FVNEGLFVY[A]VSVALLRDDCKGIVVPAI[Q]EIFPDRFVPT
¹⁵⁰
 ETINLAVKEAANHPDQDISVHV VETGNILDEEYKLAYF[K]E
 ETINLAVKEAANHPDQDISVHV VETGNILDEEYKLAYF[R]E
¹⁸⁰
 DVG TNAHHWHWHIVYPATWDPAFMGRMKDRKGELFYIMHQ
 DVG TNAHHWHWHIVYPATWDPAFMGRMKDRKGELFYIMHQ
²¹⁰
 QMCARYDCERLSNGM[H]RMIPFSNFDEKLEGYSABLTSLVS²⁴⁰
 QMCARYDCERLSNGM[R]RMIPFSNFDEKLEGYSABLTSLVS
²⁷⁰
 GLPYAFRPDGLCL[M]DLKIDIDLKEMFMRWRERILDAIDSGYY
 GLPYAFRPDGLCL[H]DLKIDIDLKEMFMRWRERILDAIDSGYY
³⁰⁰
 IDNEGHQVKLDIVDGINVLGALIESS[H]ETKNKLYGSLHN
 IDNEGHQVKLDIVDGINVLGALIESS[F]ETKNKLYGDLHN
³³⁰
 WGHVM[K]MARLQDPDHRFNENPGVMSDTSTSLRDPIFYRYH³⁶⁰
 WGHVM[-]MARLQDPDHRFNENPGVMSDTSTSLRDPIFYRYH
³⁹⁰
 RFIDNIFQKYIATLPHYTPEDLTCPGVHVNVTVNAKVPN
 RFIDNIFQKYIATLPHYTPEDLTCPGVHVNVTVNAKVPN
⁴²⁰
 VVTTFMKEAELELSYGIDFGSDHSVKVLYRHL DHEPFTYN
 VVTTFMKEAELELSYGIDFGSDHSVKVLYRHL DHEPFTYN
⁴⁵⁰
 ISVENSSGGAKDVTMRIFLGPKYDELGNRLQPEQQR TLNI⁴⁸⁰
 ISVENSSGGAKDVTMRIFLGPKYDELGNRLQPEQQR TLNI
⁵¹⁰
 ELDKFKATLDPGKNVVTDRDHRNSTVTVEQSVPVKKLREEG
 ELDKFKATLDPGKNVVTDRDHRNSTVTVEQSVPVKKLTEE G
⁵⁴⁰
 GVAGEYCS[D]G[K]PEHMLIPKGNHRGMDFELFVIVTDYAQDA
 GVAGEYCS[C]G[W]PEHMLIPKGNHRGMDFELFVIVTDYAQDA
⁵⁷⁰
 V[D]G[-]ENAECVDAVSYCGAKDQKYPDKKPMGFFPDRVIEG⁶⁰⁰
 V[N]G[H]GENAECVDAVSYCGAKDQKYPDKKPMGFFPDRVIEG
 LT[F]EEFLT[V]SMSC TDVRIKYTDIK COOH
 LT[L]EEFLT[P]SMSC TDVRIKYTDIK COOH

Abb. 41: Aminosäuresequenz der Untereinheit *e* des Hämocyanins von *E. californicum*. Obere Reihe: Proteinchemische Sequenzbestimmung durch manuelle (CHANG et al., 1978) und automatische (EDMAN und HENSCHEN, 1978) Sequenzierung (SCHNEIDER et al., 1983). Untere Reihe: Sequenzbestimmung der cDNA nach der Dideoxymethode (SANGER et al., 1977). Unterschiedliche Positionen sind umrandet.

A

<u>Cheliceraten Hämocyanine</u>	79 (107)	90 (118)	109 (138)	159 (190)	216 (247)	254 (285)	307 (339)	529 (577)	531 (579)	600 (651)	606 (657)
Eury cDNA- <u>e</u>	R	A	Q	R	R	H	F	C	W	L	P
Eury <u>e</u>	K	H	-	K	H	M	H	D	K	F	V
Eury <u>d</u>	R	A	Q	R	Q	R	H	C	K	P	P
Eury <u>a</u>	?	S	Q	R	N	H	Y	C	K	H	G
Lim <u>II</u>	R	A	Q	R	H	R	Y	C	W	I	N
Tachy <u>α</u>	R	A	E	R	H	H	H	C	W	L	T
<u>Crustaceen Hämocyanine</u>											
Pint <u>a</u>	R	A	Y	G	D	E	K	C	I	V	N
Alep <u>b</u>	R	A	Y	G	D	E	?	C	I	V	N

B

	323	-	328	561	-	568
<u>Cheliceraten Hämocyanine</u>	(355	-	360)	(609	-	616)
Eury <u>e/cDNA</u>	H V M - M A			V N G H G E N A		
Eury <u>e</u>	H V M K M A			V D G - - E N A		
Eury <u>d</u>	H V M - I A			V Q G A G E Q T		
Eury <u>a</u>	H V M - ~ A			V Q S G D G T P		
Lim <u>II</u>	H V T - M A			V D G - S E S V		
Tachy <u>α</u>	H V I - T A			V D G - - G G G		
<u>Crustaceen Hämocyanine</u>						
Pint <u>a</u>	H V M - L G					
Alep <u>b</u>	H I M - I G					

Abb. 42: Unterschiede zwischen DNA- und Protein-Sequenz der Untereinheit e des Hämocyanins von *E. californicum*.

Die unterschiedlichen Positionen werden mit den Aminosäuresequenzen von Eurypelma (Eury) Hämocyanin-Untereinheit a und d, Tachypleus tridentatus (Tachy) Hämocyanin Untereinheit α, Limulus polyphemus (Lim) Hämocyanin-Untereinheit II, Panulirus interruptus (Pint) Hämocyanin-Untereinheit a und Astacus leptodactylus (Alep) Hämocyanin-Untereinheit b verglichen.

A: Austausch einzelner Aminosäuren.

B: Deletierte, bzw. zusätzlich gefundene Aminosäuren.

Die Nummerierung ist nach SCHNEIDER et al. (1983)(obere Reihe) und LINZEN et al. (1985)(Nummerierung in Klammern).

ginsäure ein Cystein (Pos. 529), statt Lysin ein Tryptophan (Pos. 531) gefunden. Durch das zusätzlich an Pos. 529 vorhandene Cystein erhöht sich die Gesamtzahl an Cysteinresten auf zehn pro Untereinheit e. Wie aus der Röntgenstrukturanalyse einer Untereinheit eines Crustaceen-Hämocyanins (P. interruptus, UE a) bekannt ist, ist in dieser Kette der homologe Cysteinrest an der Ausbildung einer intramolekularen Disulfidbrücke beteiligt (GAYKEMA et al., 1984; LINZEN et al., 1985). Aufgrund der Sequenz der cDNA wäre eine entsprechende Brücke auch in der Untereinheit e des Vogelspinnenhämocyanins denkbar.

Zwei zusätzliche Austausche liegen ebenfalls im carboxy-terminalen Bereich: Es wurde Leucin anstelle von Phenylalanin (Pos. 600) und Prolin anstelle von Valin (Pos. 606) identifiziert.

Weitere Unterschiede betreffen einmal die Deletion des gesamten Codons für die Aminosäure Lysin (Pos. 326); hingegen codierte die cDNA für zwei zusätzliche Aminosäuren im Bereich der Pos. 563/564, für die es bei der proteinchemischen Sequenzbestimmung keinen Nachweis gab (SCHNEIDER et al., 1983). Diese Fälle könnten wahre Mikroheterogenitäten widerspiegeln. Allerdings sollte erwähnt werden, daß die cDNA-Sequenzanalysen teilweise parallel mit mRNA-Transkripten dreier Einzeltiere durchgeführt wurden. Die Aminosäureaustausche sind in keinem der angeführten Fälle auf Punktmutation in einer Triplet-Position des jeweiligen Codons zurückzuführen. Wie Abb. 42 zeigt, erhöhen die über cDNA-Sequenzanalyse identifizierten Aminosäuren den Grad an Homologie von Eurypelma UE-e zu den Primärstrukturen anderer Cheliceraten- und Crustaceen-Hämocyanine.

5. Charakteristika der cDNA-Sequenz

Für 551 Aminosäuren der Hämocyanin-Untereinheit e wurde die cDNA-Sequenz bestimmt. Der codierende Bereich der mRNA wird in 3'-Richtung durch das Stoppcodon UAG begrenzt. Es folgt die 3'-nicht-codierende Region der mRNA, die mit einer Länge von insgesamt 284 b bis zum poly(A)-Schwanz - in Relation zum Umfang des codierenden Bereichs - recht kurz ausfällt.

Betrachtet man die Sequenz des codierenden Bereichs (1653 b), so fällt der hohe Gehalt an Adenin (479 b) an der Basenzusammensetzung auf. Die drei übrigen Basen Cytosin (390 b), Guanin (388 b) und Thymin/Uracil (396 b) sind zu beinahe gleichen Anteilen in der Sequenz vertreten (Tab. 13). Nicht ungewöhnlich für eukaryontische mRNAs ist der hohe AT-Gehalt (68.55 %) der 3'-untranslatierten Region. Danach ergibt sich für die bislang entschlüsselte mRNA-Sequenz von Hc-UE e ein Gesamt-GC-Gehalt von 44.78 %. Der hohe Gehalt an Adenin scheint indes mit der Aminosäurezusammensetzung der Polypeptidkette erklärbar zu sein: Die sequenzierte cDNA codiert für 56 Lysin- und Argininreste, Aminosäuren, deren Codons jeweils in 1. und 2. Position ein Adenin als Base enthalten.

	A		C		G		T	
	b	(%)	b	(%)	b	(%)	b	(%)
codierende Region	479	(28.98)	390	(23.59)	388	(23.47)	396	(23.96)
3'-untranslatierte Region	108	(38.16)	51	(17.67)	39	(13.78)	86	(30.39)
Gesamtsequenz	587	(30.32)	441	(22.73)	427	(22.05)	482	(24.90)

GC-Gehalt (%)	
codierende Region	47.06
3'-untranslatierte Region	31.45
Gesamtsequenz	44.78

Tab. 13: Hämocyanin-mRNA der Untereinheit e.
GC-Gehalt des codierenden Bereichs (Teilsequenz, 88 % der gesamten codierenden Region), sowie der 3'-untranslatierten Region der mRNA.

Obgleich die insgesamt 4 Codons für die beiden Aminosäuren nur 6.5 % Anteil an den 61 verschiedenen Codons (für tRNAs) haben, sind sie in der cDNA überrepräsentiert (10 %). Ferner wird für die Aminosäure Glutaminsäure das Codon GAA (77 %) mit zwei Adeninresten gegenüber GAG (23 %) bevorzugt verwendet (Tab. 14).

In der analysierten cDNA wird relativ am häufigsten Cytosin als 3. Base in den Codons angetroffen (33.4 %), 25.1 % der Codons enden auf Uracil, lediglich 22.2 % auf Adenin und 19.3 % auf Guanin. Es besteht also kein Zusammenhang zwischen der Häufigkeit der 3. Base des Codons und dem Adeningehalt der Sequenz.

Die absoluten und relativen Codonhäufigkeiten synonyme Codons sind in Tab. 14 dargestellt. Nach GRANTHAM (1980) und GRANTHAM et al. (1980, 1981) werden synonyme Codons, insbesondere in stark exprimierten Genen, keineswegs zufällig ausgewählt. Vielmehr scheint der Häufigkeit, mit der ein synonymes Codon gegenüber einem weiteren in einem Gen bevorzugt vorkommt, ein Prinzip zugrunde zu liegen: Die Autoren fanden bei einem Vergleich der Codonhäufigkeiten in schwach und stark exprimierten Genen von Prokaryonten, Hefe und höheren Eukaryonten heraus, daß in hoch exprimierter mRNA solche Codons bevorzugt enthalten sind, die für die Codon-Anticodon-Paarung ein mittleres Energieniveau erfordern. Codons mit den stärksten Bindungsenergien werden in stark exprimierten Genen eher gemieden. Quartett-Tripletts etwa, die in 1. und 2. Position bereits G/C-reich sind (Codons für Prolin, Glycin, Alanin), bevorzugen in der 3. Position eine energiearme Basenpaarung zum Anticodon. In *Eurypelma*-cDNA stehen zumindest die Codons CCA/CCU (79 %) für Prolin und GGA/GGU (78 %) für Glycin in Einklang mit dieser von GRANTHAM et al. (1980, 1981) aufgestellten Regel. Für die Aminosäure Alanin fällt die Präferenz nicht so deutlich aus (GCU/GCA = 57 %). Viele der neun Duett-Tripletts, sowie das Terzett-Triplett für Isoleucin sind hingegen in den Positionen 1 und 2 A/U-reich und "energiearm", sollten also die Ba-

erste Base		zweite Base				dritte Base			
		U	C	A	G				
U		2 (0.12) UUU } Phe 23 (0.88) UUC 1 (0.02) UUA } 13 (0.30) UUG }	4 (0.15) UCU } 4 (0.15) UCC } Ser 7 (0.26) UCA 1 (0.04) UCG }	8 (0.31) UAU } Tyr 18 (0.69) UAC 0 (0.00) UAA } Stop 1 (1.00) UAG }	3 (0.30) UGU } Cys 7 (0.70) UGC 0 (0.00) UGA 6 (1.00) UGG } Trp	U C A G			
C		6 (0.14) CUU } 9 (0.21) CUC } 3 (0.07) CUA } 11 (0.26) CUG }	9 (0.35) CCU } 5 (0.19) CCC } Pro 12 (0.44) CCA 1 (0.04) CCG }	7 (0.29) CAU } His 17 (0.71) CAC 6 (0.43) CAA } Gln 8 (0.57) CAG }	9 (0.32) CGU } 2 (0.07) CGC 1 (0.03) CGA 1 (0.03) CCG }	U C A G			
A		11 (0.39) AUU } 15 (0.54) AUC } Ile 2 (0.07) AUA } 16 (1.00) AUG } Met	12 (0.43) ACU } 5 (0.18) ACC } Thr 10 (0.36) ACA 1 (0.03) ACG }	11 (0.42) AAU } Asn 15 (0.58) AAC 8 (0.27) AAA } Lys 22 (0.73) AAG }	3 (0.11) AGU } Ser 8 (0.29) AGC 9 (0.31) AGA 7 (0.24) AGG }	U C A G			
G		10 (0.22) GUU } 16 (0.36) GUC } Val 12 (0.27) GUA } 7 (0.15) GUG }	13 (0.46) GCU } 11 (0.39) GCC } Ala 3 (0.11) GCA 1 (0.04) GCG }	21 (0.49) GAU } Asp 22 (0.51) GAC 29 (0.77) GAA } Glu 9 (0.23) GAG }	9 (0.25) GGU } 7 (0.19) GGC 19 (0.53) GGA 1 (0.03) GGG }	U C A G			

Tab. 14: Codon-Häufigkeit in Hämocyanin-mRNA der Untereinheit e.

Aufstellung über die absolute und relative (in Klammer) Häufigkeit
synonymer Codons der analysierten Teilsequenz (88 % der Gesamtsequenz).

sen G/C in 3. Position bevorzugen. Auch diese Regel kann auf Eurypelma-cDNA übertragen werden, wie die Codon-Präferenzen für UUC (88 %), UAC (69 %), AAG (57 %), AAC (58 %) und des Terzett-Tripletts AUC (54 %) verdeutlichen.

Ein zweiter wichtiger Faktor scheint generell die Codon-Vorauswahl in Genen zu selektionieren: Die Verfügbarkeit des tRNA-Isoakzeptors. Quantitative Analysen von IKEMURA (1981, 1982) und IKEMURA und OZEKI (1982) zeigten eine stark positive Korrelation zwischen der Codonhäufigkeit in hoch exprimierten Genen und der zellulären Konzentration der zugehörigen tRNA. Dadurch würde eine optimale Translationseffizienz stark exprimierter Gene sichergestellt. Da die Expressionsmuster für die einzelnen tRNAs von Spezies zu Spezies variieren, ist eine weitere Beobachtung von GRANTHAM et al. (1981) erklärbar, wonach in Genen innerhalb eines Genoms der Gebrauch synonymen Codons einheitlicher ist als im Vergleich zu einer anderen Spezies. Nach GRANTHAM et al. tendiert jedes Genom zu einer eigenen Codierungsstrategie (Genom-Hypothese), die in einer speziellen Auswahl an synonymen Codons zum Ausdruck kommt. Schwach exprimierte Gene zeigen eine mehr zufällige, ungerichtete Codon-Auswahl.

Aufgrund dieser Hypothese wäre zu erwarten, daß auch die übrigen, noch zu identifizierenden Hämocyanin-cDNAs den hier für Hämocyanin-UE e vorgestellten Codonverteilungen entsprechen sollten.

Die untranslatierte Region

Die codierende Region eukaryontischer mRNAs wird am 5' und 3'-Ende von untranslatierten Regionen flankiert: Zwischen der "Cap-site" des 5'-Endes der mRNA und dem AUG-Initiationscodon der Translation können 10 bis einige hundert untranslatierte Nukleotide liegen, zwischen dem Translationsterminations-Codon und dem poly(A)-Schwanz am 3'-Ende 50 bis über 2000 Basen (DARNELL et al., 1986). In den charakterisierten cDNA-Klonen fehlte der aminoterminal Bereich der

Proteins und damit auch die 5'-Region der mRNA. Hingegen war die 3'-untranslatierte Region komplett in Klon pH393 vorhanden: Ihre Länge betrug 284 b, sie wurde am 3' -Ende von 17 Adeninresten des poly(A)-Schwanzes begrenzt.

Das wesentlichste Strukturmerkmal dieser Region stellt die Sequenz AATAAA dar, die in fast allen eukaryontischen poly(A)-RNAs enthalten ist. In *Eurypelma Hc-e*-mRNA liegt diese Hexamersequenz zwischen den Nukleotidpositionen -14 und -19 "stromaufwärts" von der poly(A)-Stelle (Abb. 43). PROUDFOOT und BROWNLEE (1976) registrierten als Erste sowohl die Konservierung der Sequenz AAUAAA an sich, als auch die strikte Lage, 10-30 Nukleotide "stromaufwärts" der poly(A)-Stelle. Durch Deletions- und Punktmutationsstudien erhellten FITZGERALD und SHENK (1981), MONTELL et al. (1983), WICKENS and STEFENSON (1984) und andere Arbeitsgruppen (Review: BIRNSTIEL et al., 1985) die Bedeutung und Funktion dieser hochkonservierten Sequenz: In polyadenylierter RNA scheint die Sequenz AAUAAA die 3'-Spaltstelle festzulegen, an der die prä-mRNA in einer frühen Phase des RNA-Processing gekürzt wird und dabei der endgültige 3'-Terminus der reifen mRNA festgelegt wird. Das primäre Transkript eukaryontischer mRNAs reicht zunächst meist weit über die poly(A)-Stelle in 3'-Richtung hinaus und besitzt heterogene 3'-Enden (NEVINS, 1983). Zeitlich kurz nach dem 3' -Processing wird der poly(A)-Schwanz bei polyadenylierter RNA an den definitiven 3'-Terminus addiert.

Punktmutationen in der Sequenz AAUAAA reduzieren gewöhnlich die Ausbeute an polyadenylierter RNA des betreffenden Gens drastisch gegenüber dem Wildtyp (HIGGS et al., 1983; WICKENS and STEFFENSON, 1984). Ebenfalls wichtig für das korrekte 3'-Splicing der prä-RNA scheint der Abstand des Hexamers von der Splice-Stelle zu sein: Eine Verkürzung dieses Abstandes durch Nukleotiddeletionen führt zu neuen 3' -Enden für die Addition des poly(A)-Schwanzes, die weiter "stromabwärts" liegen, in der Länge des Abstandes jedoch dem Wildtyp entsprechen (FITZGERALD and SHENK, 1981). Mit der anwachsen-

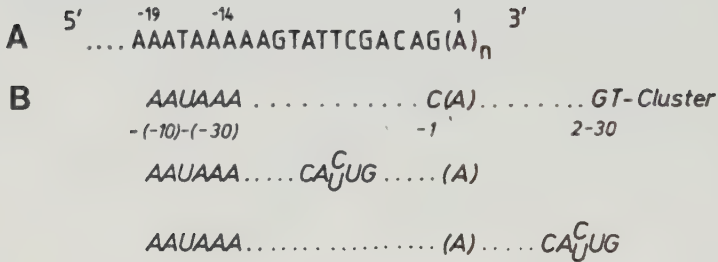


Abb. 43: Konservierte Sequenzen im Bereich des 3'-Terminus der mRNA.

A: Darstellung der 3'-terminalen Sequenz der cDNA für Hämocyanin-Untereinheit e.

B: Konservierte Sequenzmotive in eukaryontischen, polyadenylierten RNAs, die einzeln oder in Kombination für das 3'-Splicing der prä-mRNA bedeutsam sind (BIRNSTIEL et al., 1985).

den Zahl an verfügbaren Gensequenzdaten kann man feststellen, daß anstelle des hochkonservierten Hexamers AAUAAA in der Natur auch vereinzelt verwandte Sequenzen wie AUUAAA (Hühner-Lysozym-mRNA, JUNG et al., 1980), AAUUAA, AAUAAU etc. (BIRNSTIEL et al., 1985) vorkommen. Ob diese Sequenzen ein ebenso effektives Splicing des 3'-Endes gewährleisten, ist jedoch nicht hinreichend erforscht.

Durch Sequenzvergleiche eukaryontischer Gene im Bereich der poly(A)-Stelle fielen ferner konservierte Sequenzen jenseits der 3'-Splice Stelle auf, die, wie Deletionsstudien an β -Globin-RNA zeigten (GIL and PROUDFOOT, 1984), ebenfalls für korrektes 3'-Splicing der poly(A)-Stelle benötigt werden. Diese konservierten Sequenzen lassen sich in vielen Fällen auf die Consensus-Sequenz YGTGTTY (GT-Cluster) (McLAUCHLAN et al., 1985) zurückführen. Fakultativ "stromabwärts" oder "stromaufwärts" der poly(A)-Stelle ist vielfach die Sequenz CA_UG konserviert. Zahlreiche, charakterisierte polyadenylierte mRNAs besitzen als letztes Nukleotid vor dem

poly(A)-Schwanz ein Cytosin. Dies trifft jedoch für Hämocyanin-UE e-mRNA nicht zu (Abb. 43). Ob die restlichen, häufig angetroffenen Sequenzkonstellationen auch im Hämocyanin-Gen vorhanden sind, können erst Sequenzanalysen der genomischen DNA darlegen, die zur Zeit durchgeführt werden (VOLL, pers. Mitt.). Das Sequenzmotiv AAUAAA ist auch in der Hämocyanin-mRNA-e vorhanden, zwischen diesem Hexamer und der poly(A)-Stelle existiert jedoch keine Sequenz des CA_U^CUG-Motivs (Abb. 43).

Die gesamte 3'-untranslatierte Region ist sehr AT-reich (AT-Gehalt 68.55 %). Neben poly(A)- und poly(T/U)-Sequenzen ist häufig die Sequenz C(T)_{n=1-7} vorhanden. Dieses Sequenzmotiv ist keineswegs auf die untersuchte Hämocyanin-mRNA beschränkt, sondern kommt häufig in den 3' -untranslatierten mRNA-Regionen zahlreicher Gene vor.

E. ZUSAMMENFASSUNG

1. Hämocyanin wird bei der Vogelspinne *Eurypelma californicum* in Hämocyten der Herzinnenwand synthetisiert. Durch Hämolymphentnahme wurde die Proliferation der Hämocyten stimuliert und RNA des Herzgewebes nach der Guanidiniumisothiocyanat-Cäsiumchlorid-Methode isoliert.

2. Herzgewebe-RNA wurde in vitro in Kaninchenreticulocytenslysaten in Gegenwart von ^{35}S -Methionin translatiert und die Translationsprodukte mit Antiserum gegen dissoziiertes 37 S-Hämocyanin und Protein A-Sepharose charakterisiert. Die Analyse im SDS-Polyacrylamidgel zeigte ein vollkommen identisches Bandenmuster von authentischem Hämocyanin aus *E. californicum* und ^{35}S -Immunpräzipitaten der in vitro-Translationsprodukte. Zwischen 7 und 10 % der Translationsprodukte reagierten mit dem heterologen Antiserum.

3. Aus Herzgewebe-RNA wurden insgesamt 4 cDNA-Genbanken (I-IV) in pUC- und pBR322-Plasmiden erstellt. Um Aufschluß über eventuelle Mikroheterogenität zu erhalten, wurde jeweils mit Einzeltieren gearbeitet.

4. Die Klone von cDNA-Genbank I wurden mit einer gemischten 17-mer Oligonukleotidprobe, die der Aminosäuresequenz des stark konservierten "Kupfer A"-Bindungszentrums entsprach, hybridisiert. Ein Klon, Klon pH4, hybridisierte mit der Oligonukleotidprobe.

5. Die cDNA des Klons pH4 hatte eine Länge von 1.6 kb. Sie wurde nach Subklonierung in M13 Phagen-Vektoren vollständig nach der Dideoxymethode sequenziert. Die DNA-Sequenz enthielt einen zum 3' und 5' Ende hin offenen Leserahmen, die abgeleitete Aminosäuresequenz stimmte in 98 % der Positionen mit der Sequenz der Untereinheit e des *Eurypelma*-Hämocyanins

überein. Aminoterminal fehlten 73 Aminosäurecodons, carboxyterminal 24 Codons für Kette e.

6. Mit cDNA pHC4 wurden über Kolonien-Hybridisierung in den Genbanken III und IV weitere Hämocyanin-cDNA-Klone gefunden und diese teilweise über Southern-Blotting und DNA-Sequenzierung eingehender charakterisiert. Alle diese analysierten Klone (Klon pHCC5, pHC450, pHC393) enthielten cDNAs für Untereinheit e des Vogelspinnenhämocyanins.

7. Die cDNA des Klons pHC393 codiert für den gesamten carboxyterminalen Bereich der Kette e und enthält die komplette 3' untranslatierte Region der mRNA für Kette e. In der 284 b langen, nicht codierenden Sequenz ist, 14 Nukleotide "stromaufwärts" der poly(A)-Stelle, das Splice- und Polyadenylierungssignal "AAUAAA" enthalten.

8. Mikroheterogenitäten wurden bei den Sequenzanalysen der cDNAs für Kette e aus drei verschiedenen Einzeltieren nicht festgestellt. Die cDNAs der Klone pHC4 und pHC393 decken zusammen 88 % der codierenden Region von Hämocyanin-mRNA e ab. cDNA-Sequenz und proteinchemisch bestimmte Aminosäuresequenz stimmten in 97 % der verglichenen Positionen überein.

9. Unter stringenten Hybridisierungsbedingungen wurden mit UE-e-spezifischer cDNA-Probe keine Kreuzhybridisierungen zu cDNAs für andere Untereinheiten festgestellt. Mäßig stringente Hybridisierungsbedingungen erwiesen sich als ungeeignet, um cDNAs für weitere Hämocyaninketten zu finden.

10. Demgegenüber erwies sich eine gemischte 17-mer Oligonukleotidprobe des "Kupfer B"-Bindungszentrums als brauchbare Sonde für Hämocyanin-Klone. Bei der Kolonien-Hybridisierung eines Teils von Genbank IV hybridisierte Klon pHCC79 mit dem Oligonukleotid.

F. ANHANG

Analyse des Klons p580 aus Genbank II

1. Hybridisierung der cDNA des Klons p580 mit $\alpha^{32}\text{P}$ markiertem 1300 Bam HI/Bam HI-Fragment von Klon pHc4.

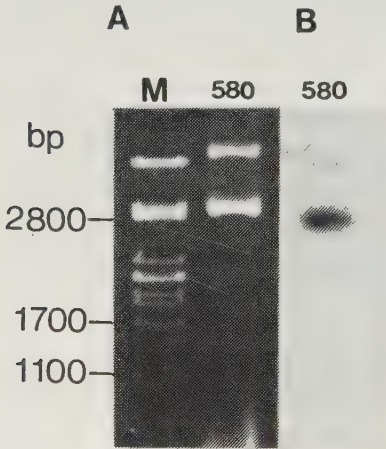


Abb. 44: Agarosegel-Elektrophorese von cDNA p580 in Plasmid pBR322.

(A), Agarosegel, mit Ethidiumbromid gefärbt. M: Marker λ -DNA/Pst I.

(B), Autoradiographie des Southern Blots. Die Hybridisierung mit ^{32}P -markiertem pHc4-cDNA-Fragment fand unter mäßig stringenten Bedingungen statt.

Hybridisierung: bei 42 °C über Nacht in 50 % Formamid, 6 x SSC, 0.1 % SDS, 5 x Denhardt's, 0.1 mg/ml denaturierte Lachs-DNA, 1×10^6 cpm/ml radioaktive Probe.

Waschen: 2 x 30 min in 2 x SSC, 0.1 % SDS bei 45 °C.

Exposition: 10 Stunden mit Verstärkerfolien bei -70 °C.

2. Sequenzanalyse des Klons p580

Die cDNA des Klons p580 wurde nach Umklonierung in den Vektor pUC19 über Bam HI/Kpn I-Restriktion linearisiert und anschließend mit den Exonukleasen III/VII deletiert.

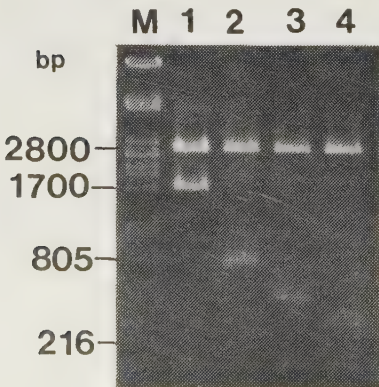


Abb. 45: Agarosegelelektrophorese von Deletionsmutanten des Klons p580.

Die Plasmid-cDNA verschiedener Deletionsmutanten wurde isoliert, mit den Enzymen Hind III und Eco RI restringiert und im Agarosegel (1.2 %) analysiert.

(1), Gesamte p580-cDNA, nicht deletiert.

(2)-(4), Deletionsmutanten. (2), 13D, 800 bp; (3), 13E, 600 bp; (4), 13F, 470 bp.

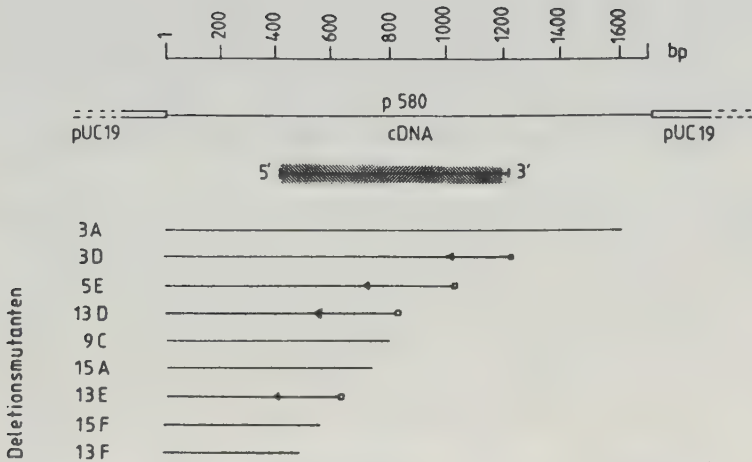


Abb. 46: Deletionsmutanten des Klons p580.

Schematische Darstellung des Ausmaßes an DNA-Deletion der 1700 bp langen cDNA p580 anhand isolierter Deletionsmutanten.

Der durch Sequenzanalyse charakterisierte Bereich der cDNA ist schattiert dargestellt, die sequenzierten Regionen ausgesuchter Deletionsmutanten sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Sequenziert wurde nach der Dideoxymethode sowohl im Plasmid pUC19 als auch - nach Umklonierung der deletierten cDNA-Fragmente - in M13mp10 und mp11.

5' CGTCTG ATGGAG TCTATC ATTTGT GGTGGT GGAGGT ACTCCC TGACCT TCTGGG ATGAGA 60

CCTCCA ATCTAC GCCACC ACCAAC CTTGGG CTGTTC ACCTTG CTTTGC TAATAT TGTACC 120

ACTACG TTGATG AATATC AGAAAG GTATGA CTTCAT GTCCCC TGATGT TTGCAC CATCTC 180

← 13E →

CCTCTG GCCTCC TAGAAT GGAGTC TATCAT TTGTGG TGGTGG AGGTAC TCCCTG ACCTTG 240

TGGGAT GTGTCC TCCAAC TTGAAC AGCTGC CAGTAA GGACAT GGCTCT TTCTAG CCTGCC 300

TATAAC TTCATC TAATTT TCATGT AAGGCT TTAAGA CTTTCA AACATC GAACTC TGCCCA 360

← 5E →

TGAAAA ATTTGC TGAAGT CCCTTT GCTGGT GACTAT CATAGG CATCCT CAGGAT TGTACT 420

← 13D →

CCATGT CCTTTC GATGAG CTTTGT CAGGGG TGCTGT TTTCGG TATTCT TCCTTT TGCTTT 480

TCTAAT TTTTCT TTGTAC TCATCA TATTCT TTGGAA AATTTT TCTTTT TCAGCA TCTGCA 540

ATTGTT TGTGAT GTAGGC AGCACA CCTGGA GGATAC AAGCTG TATGTA AGAAAT TTCAAA 600

← 3D →

GCATCA TGGTCA TCTGCT AGGCCT CCTATG GCTGCT GACTTT CAAAAA TATCCA TGCTGT 660

← 5E →

GGTAAA TGCTCG TTTTCA GTCAT AGTCTT CATCAT TGTGGT TGTTTC CAGGAT GAAACA 720

ATTACC GTAACA ACATTT TTGTAG TATTGG ATTTTA CGCTTA CAGGGA ATGGTT TATTCC 780

TAATAT CCCTCA AGCAAG ATGCCT ACTGCT GATTGA TTCCAT CAGTCT GGTGAT CATATT 840

← 3D → 3'

GTTTTG TTCCTA GTAAA

Abb. 47: Teilsequenz der cDNA des Klons p580.

Die Pfeile zeigen Beginn und Ende der sequenzierten DNA-Bereiche der verwendeten Deletionsmutanten 13E, 13D, 5E und 3D (siehe Abb. 46).

In keinem der komplementären DNA-Stränge wurde ein längerer Leserahmen, noch, wie die Computerauswertung zeigte, eindeutig homologe DNA-Ab-schnitte zur Hämocyanin-cDNA pHc4/pHC393 gefunden.

G. LITERATUR

- ALLIEL, P.M., DAUTIGNY, A., LAMY, J., LAMY, J.-N., and JOLLES, P. (1983): Cell-free synthesis of hemocyanin from scorpion *Androctonus australis*. *Eur. J. Biochem.* 134, 407-414.
- AMARA, S.G., JONAS, V., ROSENFELD, M.G., ONG, E.S., and EVANS, R.M. (1982): Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. *Nature* 298, 240-244.
- ANDERSON, M.L.M. and YOUNG, B.D. (1985): Quantitative filter hybridisation. In: *Nucleic acid hybridisation. A practical approach* (HAMES, B.D. and HIGGINS, S.J., eds.), 73-111. IRL Press, Oxford.
- AVISSAR, I., DANIEL, V., and DANIEL, E. (1981): In vitro synthesis of hemocyanin. *Comp. Biochem. Physiol.* 70B, 815-818.
- AVISSAR, I., DANIEL, V., and DANIEL, E. (1983): Partial purification of scorpion hemocyanin messenger RNA. *Comp. Biochem. Physiol.* 75B, 327-330.
- AVISSAR, I., DANIEL, E., and DANIEL, V. (1986a): Haemocyanin mRNA from arthropod and mollusc origin. Evidence for a multi-unit structure in mollusc haemocyanin mRNA. *Biochem. J.* 223, 253-257.
- AVISSAR, I., DANIEL, V. and DANIEL, E. (1986b): A comparative study of arthropod and mollusc hemocyanin mRNA. In: *Invertebrate oxygen carriers* (LINZEN, B., ed.), 481-484. Springer-Verlag, Heidelberg.
- BAK, A.J., NEUTEBOOM, B., JEKEL, A., SOETER, N.M., VEREIJKEN, J.M. and BEINTEMA, J.J. (1986): Structure of arthropodan hemocyanin. *FEBS Lett.* 204, 141-144.
- BIGGIN, M.D., GIBSON, T.J. and HONG, G.F. (1983): Buffer gradient gels and ³⁵S-label as an aid to rapid DNA sequence determination. *Proc. Natl. Acad. USA* 80, 3963-3965.
- BIRNBOIM, C. and DOLY, J. (1979): Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7, 1513-1523.
- BIRNSTIEL, M.L., BUSSLINGER, M., and STRUB, K. (1985): Transcription termination and 3' processing: the end is in site! *Cell* 41, 349-359.
- BOLIVAR, F., RODRIGUEZ, R.L., GREENE, P.J., BETTLACH, M.C., HEYNECKER, H.L., BOYER, H.W., CROSA, J.H., and FALKOW, S. (1977): Construction and characterisation of new cloning vehicles. II. A multipurpose system. *Gene* 2, 95-113.
- BOLLUM, F.J. (1974): Terminal deoxynucleotidyl transferase. In: *The Enzymes* (BOYER, P.D., ed.) X, 145-171. Academic Press, New York.

- BONNER, W.M. and LASKEY, R.A. (1974): A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamid gels. *Eur. J. Biochem.* 46, 83-88.
- BREITBART, R.E., ANDREADIS, A., and NADAL-GINARD, B. (1987): Alternative splicing: A ubiquitous mechanism for the generation of multiple protein isoforms from singele genes. *Ann. Rev. Biochem.* 56, 467-95.
- BRL (1986): E. coli DH5 α competent cells. BRL FOCUS 9, No.2, 9.
- BRUTLAG, D., FRY, K., NELSON, T., and HUNG, P. (1977): Synthesis of hybrid bacterial plasmids containing highly repeated satellite DNA. *Cell* 10, 509-519.
- CHANG, J.Y., BRAUER, D., and WITTMANN-LIEBOLD, B. (1978): Micro-sequence analysis of peptides and proteins using 4-N,N-dimethylaminoazobenzene 4' -isothiocyanate/phenylisothiocyanate double coupling method. *FEBS Lett.* 93, 205-214.
- CHEN, E.J. and SEEBURG, P.H. (1985): Supercoil sequencing: a fast simple method for sequencing plasmid DNA. *DNA* 4, 165-170.
- CHIRGWIN, J.M., PRZYBYLA, A.E., MacDONALD, R.J., and RUTTER, W.J. (1979): Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18, 5294-5299.
- DARNELL, J., LODISH, H., and BALTIMORE, D. (1986): Molecular cell biology. Scientific American Books, New York.
- DEBEIRE, P., MONTREUIL, J., GOYFFON, M., VAN KUIK, A.J., VAN HALBEEK, H., and VLIEGENTHART, J.F.G. (1986): Primary structure of the oligo-saccharide moiety of hemocyanin from the scorpion *Androctonus australis*. *Carbohydrate Res.* 151, 305-310.
- DE BETHUNE, B., CLEUTER, Y., MARBAIX, G., and PREAUX, G. (1985): Site of biosynthesis of the haemocyanin in the crayfish *Astacus leptodactylus*. *Arch. Intern. Physiol. Biochim.* 93, B75.
- DENG, G. and WU, R. (1981): An improved procedure for utilizing terminal transferase to add homopolymers to the 3' termini of DNA. *Nucl. Acids Res.* 9, 4173-4188.
- DILLY, P.N. and MESSENGER, J.B. (1972): The branchial gland: A site of haemocyanin synthesis in octopus. *Z. Zellforsch.* 132, 193-201.
- DÖRPER, T. and WINNACKER, E.-L. (1983): Improvements in the phosphoramidite procedure for the synthesis of oligodeoxyribonucleotides. *Nucl. Acids Res.* 11, 2575-2584.
- DREXEL, R., SIEGMUND, S., SCHNEIDER, H.-J., LINZEN, B., GIELENS, C., PREAUX, G., LONTIE, R., KELLERMANN, J., and LOTTSPEICH, F. (1987): Complete amino-acid sequence of a functional unit from a molluscan hemocyanin (*Helix pomatia*). *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 368, 617-635.

- EDMAN, P. and HENSCHEN, A. (1975): Protein sequence determination. In: Protein sequence determination, second edn. (NEEDLEMAN, S.B., ed.), 232-279. Springer-Verlag, Heidelberg.
- ELLERTON, H.D., ELLERTON, N.F., and ROBINSON, H.A. (1983): Hemocyanin - a current perspective. *Progr. Biophys. Mol. Biol.* 41, 143-258.
- FAHRENBACH (1970): The cyanoblast: hemocyanin formation in *Limulus polyphemus*. *J. Cell. Biol.* 25, 525-529.
- FITZGERALD, M. and SHENK, T. (1981): The sequence 5' -AAUAAA-3' forms part of the recognition site for polyadenylation of late SV40 mRNAs. *Cell* 24, 251-260.
- FLAMM, W.G., BIRNSTIEL, M.L., and WALKER, P.M.B. (1972): Isopycnic centrifugation of DNA: methods and applications. In: *Subcellular components, preparation and fractionation* (BIRNIE, G.D. ed.), 279-310. Butterworths, Washington, D.C.
- GAROFF, H. and ANSORGE, W. (1981): Improvement of DNA sequencing gels. *Anal. Biochem.* 115, 450-457.
- GAYKEMA, W.P.J., HOL, W.G.J., VEREIJKEN, J.M., SOETER, N.M., BAK, H.J., and BEINTEMA, J.J. (1984): 3.2 Å structure of the copper-containing oxygen-carrying protein of *Panulirus interruptus* haemocyanin. *Nature* 309, 23-29.
- GIL, A. and PROUDFOOT, N.J. (1984): A sequence downstream of AAUAAA is required for rabbit β -globin mRNA 3' - end formation. *Nature* 312, 473-474.
- GHIRETTI-MAGALDI, A., MILANESI, C., and TOGNON, G. (1977): Hemopoiesis in crustacea decapoda: origin and evolution of hemocytes and cyanocytes of *Carcinus maenas*. *Cell Differentiation* 6, 167-186.
- GODING, J.W. (1978): Use of staphylococcal protein A as an immunological reagent. *J. Immunol. Methods* 20, 241-253.
- GRANTHAM, R. (1980): Workings of the genetic code. *Trends Biochem. Sci.* 5, 327-331.
- GRANTHAM, R., GAUTIER, C., and GOUY, M. (1980): Codon frequencies in 119 individual genes confirm consistent choices of degenerate bases according to genome type. *Nucl. Acids Res.* 8, 1893-1912.
- GRANTHAM, R., GAUTIER, C., GOUY, M., JACOBZONE, M., and MERCIER, R. (1981): Codon catalog usage is a genome strategy modulated for gene expressivity. *Nucl. Acids Res.* 9, r43-r74.
- GUBLER, U. and HOFFMAN, B.J. (1983): A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene* 25, 263-269.
- HANAHAHAN, D. and MESELSON, M. (1980): Plasmid screening at high colony density. *Gene* 10, 63-67.

- HANAHAN, D. (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557-580.
- HANAHAN, D. (1985): Techniques for transformation of *E. coli*. In: DNA cloning (GLOVER, D.M., ed.), 1, 109-135. IRL Press, Oxford.
- HATTORI, M. and SAKAKI, Y. (1986): Dideoxy Sequencing method using denatured plasmid templates. *Anal. Biochem.* 152, 232-238.
- HEINRICH, P. (1986): Guidelines for quick and simple plasmid sequencing. Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica, Mannheim.
- HIGGS, D.R., GOODBOURN, S.E.Y., LAMB, J., LEGG, J.B., WEATHERALL, D.J., and PROUDFOOT, N.J. (1983): α -Thalassaemia caused by a polyadenylation signal mutation. *Nature* 306, 398-400.
- HOLMES, D.S. and QUIGLEY, M. (1981): A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* 114, 193-197.
- HUYNH, T.V., YOUNG, R.A., and DAVIS, R.W. (1985): Constructing and screening cDNA libraries in gt10 and gt11. In: DNA cloning (GLOVER, D.M., ed.) 1, 49-78. IRL Press, Oxford.
- IKEMURA, T. (1981): Correlation between the abundance of *Escherichia coli* transfer RNAs and the occurrence of the repetitive codons in its protein genes. *J. Mol. Biol.* 146, 1-21.
- IKEMURA, T. (1982): Correlation between the abundance of yeast transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in protein genes: Differences in synonymous codon choice patterns of yeast and *Escherichia coli* with reference to the abundance of the isoacceptor transfer RNAs. *J. Mol. Biol.* 158, 573-579.
- IKEMURA, T. and OZEKI, H. (1982): Codon usage and transfer RNA contents: Organism-specific codon-choice patterns in reference to the isoacceptor contents. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 47, 1087-1096.
- JACOBS, M.-P., LONTIE, R., and PREAUX, G. (1984): Isolation of an active haemocyanin-mRNA-containing fraction from *Cancer pagurus*. *Arch. Intern. Physiol. Biochim.* 92, B30.
- JUNG, A., SIPPEL, A.E., GREZ, M., and SCHÜTZ, G. (1980): Exons encode functional and structural units of chicken lysozyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 5759-5763.
- KELLERMANN, J. (1982): Über das Vorkommen von Kohlenhydraten in der Kette e des Hämocyanins der Vogelspinne *Eurypelma californicum*. Diplomarbeit, Universität München.
- KEMPTER, B. (1983): Site of hemocyanin biosynthesis in the tarantula *Eurypelma californicum*. *Naturwissenschaften* 70, 255-256.
- KEMPTER, B. (1986): Intracellular hemocyanin and site of biosynthesis in the spider *Eurypelma californicum*. In: *Invertebrate oxygen carriers* (LINZEN, B., ed.), 489-494. Springer-Verlag, Heidelberg.

- KESSLER, S.W. (1981): Use of protein A-bearing Staphylococci for the immunoprecipitation and isolation of antigens from cells. *Methods Enzymol.* 73, 442-459.
- LAEMMLI, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- LAMY, J., LAMY, J., WEILL, J., MARKL, J., SCHNEIDER, H.-J., and LINZEN, B. (1979): Immunological comparison of the subunits of *Eurypelma californicum* hemocyanin. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 360, 889-895.
- LANGLEY, K.E., VILLAREJO, M.R., FOWLER, A.V., ZAMENHOF, P.J., and ZABIN, I. (1975): Molecular basis of β -galactosidase α -complementation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 1254-1257.
- LEWIN, B. (1980): *Gene Expression* 2. Wiley, New York.
- LINZEN, B., SOETER, N.M., RIGGS, A.F., SCHNEIDER, H.-J., SCHARTAU, W., MOORE, M.D., YOKOTA, E., BEHRENS, P.Q., NAKASHIMA, H., TAKAGI, T., VEREIJKEN, J.M., BAK, H.J., BEINTEMA, J.J., VOLBEDA, A., GAYKEMA, W.P.J., and HOL, W.G.J. (1985): The structure of arthropod hemocyanins. *Science* 229, 519-524.
- LOEWE, R. and LINZEN, B. (1973): Subunits and stability region of *Dugesia californicum* hemocyanin. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 354, 182-188.
- MacSWEEN, J.M. and EASTWOOD, S.L. (1981): Recovery of antigen from staphylococcal protein A-antibody adsorbents. *Methods Enzymol.* 73, 459-471.
- MANDEL, M. and HIGA, A. (1970): Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* 53, 154-162.
- MANIATIS, T., FRITSCH, E.F., and SAMBROOK, J. (1982): *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- MANS, R.J. and NOVELLI, G.D. (1961): Measurement of the incorporation of radioactive amino acids into protein by a filter-paper disk method. *Arch. Biochem. Biophys.* 94, 48-53.
- MARCU, K.B., VALBUENA, O., and PERRY, R.P. (1978): Isolation, purification, and properties of mouse heavy-chain immunoglobulin mRNAs. *Biochemistry* 17, 1723-1733.
- MARKL, J., STRYCH, W., SCHARTAU, W., SCHNEIDER, H.-J., SCHÖBERL, P., and LINZEN, B. (1979): Comparison of the polypeptide chains of *Eurypelma californicum* hemocyanin. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 360, 639-650.

- MARKL, J., SABEL, A., and LINZEN, B. (1981): Subunit composition of dissociation intermediates and its bearing on quaternary structure of *Eurypelma californicum* hemocyanin. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 362, 429-437.
- MARKL, J. (1986): Evolution and function of structurally diverse subunits in the respiratory protein hemocyanin from arthropods. *Biol. Bull.* 171, 90-115.
- MASON, P.J. and WILLIAMS, J.G. (1985): Hybridisation in the analysis of recombinant DNA. In: *Nucleic acid hybridisation. A practical approach* (HAMES, B.D. and HIGGINS, S.J., eds.), 113-137. IRL Press, Oxford.
- MAXAM, A.M. and GILBERT, W. (1977): A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 560-564.
- MAXAM, A.M. and GILBERT, W. (1980): Sequencing end-labelled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods Enzymol.* 65, 499-560.
- MCDONNELL, M.W., SIMON, M.N., and STUDIER, F.W. (1977): Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *J. Mol. Biol.* 110, 119-146.
- MCMASTER, G.K. and CARMICHAEL, G.G. (1977): Analysis of single and double-stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 4835-4839.
- MCCLAUCHLAN, J., GAFFNEY, D., WHITTON, J.L., and CLEMENTS, J.B. (1985): The consensus sequence YGTGTTY located downstream from the AATAAA signal is required for efficient formation of mRNA 3' termini. *Nucl. Acids Res.* 13, 1347-1368.
- MERRICK, W.C. (1983): Translation of exogenous mRNAs in reticulocyte lysates. *Methods Enzymol.* 101, 606-615.
- MESSINGER, J.B., MUZZI, E.O., NARDI, G., and STEINBERG, H. (1974): Haemocyanin synthesis and the branchial gland of Octopus. *Nature* 250, 154-155.
- MESSING, J., GRONENBORN, B., MÜLLER-HILL, B., and HOFSCHEIDER, P.H. (1977): Filamentous coliphage M13 as a cloning vehicle: insertion of a Hind III fragment of the lac regulatory region in M13 replicative form in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 3642-3646.
- MESSING, J. (1981): M13mp2 and derivatives: A molecular cloning system for DNA sequencing, strand specific hybridisation, and in vitro mutagenesis. In: *Recombinant DNA, Proceeding of the Third Cleveland Symposium on Macromolecules* (WALTER, A.G., ed.). Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam.
- MESSING, J. and VIEIRA, J. (1982): A new pair of M13 vectors for selecting either DNA strand of double-digest restriction fragments. *Gene* 19, 269-276.

- MESSING, J. (1983): New M13 vectors for cloning. *Methods Enzymol.* 101, 20-78.
- MONTPELL, C.E., FISHER, E.F., CARUTHERS, M.H., and BERK, A.J. (1983): Inhibition of RNA cleavage but not polyadenylation by a point mutation in the mRNA 3' consensus sequence AAUAAA. *Nature* 305, 600-605.
- MORSE, M.P., MEYHÖFER, E., OTTO, J.J., and KUZIRIAN, A.M. (1986): Hemocyanin respiratory pigment in bivalve mollusks. *Science* 231, 1302-1304.
- MUZII, E. (1981): Intracellular polymerized haemocyanin in the branchial gland of a cephalopod. *Cell Tissue Res.* 220, 435-438.
- NABESHIMA, Y., FUJII-KURIYAMA, Y., MURAMATSU, M., and OGATA, K. (1984): Alternative transcription and two modes of splicing result in two myosin light chains from one gene. *Nature* 308, 333-338.
- NEVINS, J.R. (1983): The pathway of eukaryotic mRNA formation. *Ann. Rev. Biochem.* 52, 441-466.
- OTSUKA, A. (1981): Recovery of DNA fragments inserted by the "tailing" method: regeneration of Pst I restriction sites. *Gene* 13, 339-346.
- PELHAM, H.R.B. and JACKSON, R.J. (1976): An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur. J. Biochem.* 67, 247-256.
- PREAUX, G., VANDAMME, A., DE BETHUNE, B., JACOBS, M.-P., and LONTIE, R. (1986): Haemocyanin-mRNA-rich fractions of cephalopodan Decabrachia and Crustacea, their in vivo and in vitro translation. In: *Invertebrate oxygen carriers* (LINZEN, B., ed.), 485-488, Springer-Verlag, Heidelberg.
- PROUDFOOT, N.J. and BROWNLEE, G.G. (1976): 3' non-coding region sequences in eukaryotic messenger RNA. *Nature* 263, 211-214.
- REGER, J.F. (1973): A fine structure study on hemocyanin formation in the slug *Limax* sp. *J. Ultrastructure Res.* 43, 377-387.
- RIGBY, P.W.J., DIECKMANN, M., RHODES, C., and BERG, P. (1977): Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* 113, 237-251.
- ROYCHOUDHURY, R., JAY, E., and WU, R. (1976): Terminal labelling and addition of homopolymer tracts to duplex DNA fragments by terminal deoxynucleotidyl transferase. *Nucl. Acids Res.* 3, 101
- ROYCHOUDHURY, R. and WU, R. (1980): Terminal transferase-catalyzed addition of nucleotides to the 3' termini of DNA. *Methods Enzymol.* 65, 43-64.

- SANGER, F., NICKLEN, S., and COULSON, A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467.
- SCHARTAU, W., EYERLE, F., REISINGER, P., GEISERT, H., STORZ, H., and LINZEN, B. (1983): Complete amino-acid sequence of subunit d from Eurypelma californicum hemocyanin, and comparison to chain e. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 364, 1383-1409.
- SCHARTAU, W., METZGER, W., SONNER, P., and PYSNY, W. (1986): Hemocyanin of the spider Eurypelma californicum: Amino acid sequence of subunit a and of the smaller CB-peptides of subunits b and c. In: Invertebrate oxygen carriers (LINZEN, B., ed.), 177-184. Springer-Verlag, Heidelberg.
- SCHARTAU, W. and LEIDESCHER, T. (1983): Composition of the hemolymph of the tarantula Eurypelma californicum. J. Comp. Physiol. 152, 73-77.
- SCHIPP, R., HÖHN, P. und GINKEL, G. (1973): Elektronenmikroskopische und histochemische Untersuchungen zur Funktion der Branchialdrüse (Parabranchialdrüse) der Cephalopoda. Z. Zellforsch. 139, 253-269.
- SCHMEKEL, L. und WEISCHER, M.L. (1973): Die Blutdrüse der Doridoidea (Gastropoda, Opisthobranchia) als Ort möglicher Hämocyanin-Synthese. Z. Morph. Tiere 76, 261-284.
- SCHNEIDER, H.-J., MARKL, J., SCHARTAU, W., and LINZEN, B. (1977): Subunit heterogeneity of Eurypelma (Dugesia) hemocyanin, and separation of polypeptide chains. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 358, 1133-1141.
- SCHNEIDER, H.-J., ILLIG, U., MÜLLER, E., LINZEN, B., LOTTSPEICH, F., and HENSCHEN, A. (1982): A presumptive active-site sequence of arthropodan hemocyanins. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 363, 487-492.
- SCHNEIDER, H.-J., DREXEL, R., FELDMAIER, G., LINZEN, B., LOTTSPEICH, F., HENSCHEN, A. (1983): Complete amino-acid sequence of subunit e from Eurypelma californicum hemocyanin. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 364, 1357-1381.
- SCHNEIDER, H.-J., VOLL, W., LEHMANN, L., GRISSHAMMER, R., GOETTGENS, A., and LINZEN, B. (1986): Partial amino acid sequence of crayfish (Astacus leptodactylus) hemocyanin. In: Invertebrate oxygen carriers (LINZEN, B., ed.), 173-176. Springer-Verlag, Heidelberg.
- SCHÖNENBERGER, N., COX, J.A., and GABBIANI, G. (1980): Evidence for hemocyanin formation in the compound eye of Squilla mantis (Crustacea Stomatopoda). Cell Tissue Res. 205, 397-409.
- SCHOPF, J.W. (1978): The evolution of the earliest cells. Sci. Amer. 239, No.3, 84-102.

- SENKBEIL, E.G. and WRISTON, J.C. (1981): Hemocyanin synthesis in the american lobster, *Homarus americanus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 68B, 163-171.
- SHERMAN, R.G. and PAX, R.A. (1970): The spider heart. *Exp. in Physiol. and Biochem.* 3, 351-364.
- SIGGENS, K.W. and WOOD, E.J. (1983): Translation of mRNA from *Limulus polyphemus* hemocyanin polypeptides in vitro: Studies on subunit heterogeneity. *Eur. J. Biochem.* 131, 353-358.
- SKELDING, J.M. and NEWELL, P.F. (1975): On the function of the pore cells in the connective tissue of terrestrial pulmonate molluscs. *Cell Tissue Res.* 156, 381-390.
- SMINIA, T. (1972): Structure and function of blood and connective tissue cells of the fresh water pulmonate *Lymnaea stagnalis* studies by electron microscopy and enzyme histochemistry. *Z. Zellforsch.* 130, 497-526.
- SMINIA, T. and BOER, H.H. (1973): Haemocyanin production in pore cells of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Z. Zellforsch.* 145, 443-445.
- SMINIA, T. (1977): Hemocyanin-producing cells in gastropod molluscs. In: Structure and function of hemocyanins (BANNISTER, J., ed.), 279-288. Springer-Verlag, Heidelberg.
- SMINIA, T. and VLUGT-VAN DAALEN (1977): Haemocyanin synthesis in pore cells of the terrestrial snail *Helix aspera*. *Cell Tissue Res.* 183, 299-301.
- SOETER, N.M., BEINTEMA, J.J., JEKEL, P.A., BAK, H.J., VEREIJKEN, J.J., and NEUTEBOOM, B. (1986): Subunits a, b and c of *Panulirus interruptus* hemocyanin and evolution of arthropod hemocyanins. In: Invertebrate oxygen carriers (LINZEN, B., ed.), 153-163. Springer-Verlag, Heidelberg.
- SOUTHERN, E. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-517.
- SZOSTAK, J.W., STILES, J.I., TYE, B.-K., CHIU, P., SHERMAN, F., and WU, R. (1979): Hybridisation with synthetic oligonucleotides. *Methods Enzymol.* 68, 419-429.
- THAYER, R.E. (1979): An improved method for detecting foreign DNA in plasmids of *Escherichia coli*. *Anal. Biochem.* 98, 60-63.
- THOMAS, P.S. (1980): Hybridisation of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 5201-5205.

- THOMAS, P.S. (1983): Hybridisation of denatured RNA transferred or dotted to nitrocellulose-paper. *Methods Enzymol.* 100, 255-266.
- VANDAMME, A.-M., CLEUTER, Y., MARBAIX, G., PREAUX, G., and LONTIE, R. (1985): Isolation of haemocyanin-synthesizing polysomes from the branchial glands of *Sepia officinalis*. *Arch. Intern. Physiol. Biochim.* 93, B115-B116.
- VANDAMME, A.-M., PREAUX, G., and LONTIE, R. (1987): Isolation of mRNA from membrane-bound polysomes synthesizing *Sepia officinalis* hemocyanin in *Xenopus* oocytes. *Biochem. Intern.* 14, 27-35.
- VANDERBEKE, E., CLEUTER, Y., MARBAIX, G., PREAUX, G., and LONTIE, R. (1981): Isolation and translation of a haemocyanin-mRNA-containing fraction from *Loligo vulgaris*. *Arch. Intern. Physiol. Biochim.* 89, B135-B136.
- VANDERBEKE, E., CLEUTER, Y., MARBAIX, G., PREAUX, G., and LONTIE, R. (1982): Synthesis of haemocyanin in *Xenopus* oocytes microinjected with the polyadenylated RNA fraction isolated from the gills of *Sepia officinalis* and *Loligo vulgaris*. *Biochem. Intern.* 5, 23-29.
- VAN HOLDE, K.E. and MILLER, K.I. (1982): Haemocyanins. *Quart. Rev. Biophys.* 15, 1-129.
- VAN KUIK, J.A., VAN HALBEEK, H., KAMERLING, J.P., and VLIEGENTHART, F.G. (1986): Primary structure of the neutral carbohydrate chains of hemocyanin from *Panulirus interruptus*. *Eur. J. Biochem.* 159, 297-301.
- VIEIRA, J. and MESSING, J. (1982): The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* 19, 259-268.
- VOIT, R. (1984): Hämocyanin-mRNA aus der Vogelspinne *Eurypelma californicum*: Translation in vitro und reverse Transkription. Diplomarbeit, Universität München.
- VOIT, R. and SCHNEIDER, H.-J. (1986a): Tarantula hemocyanin mRNA. In vitro translation, cDNA cloning and nucleotide sequence corresponding to subunit e. *Eur. J. Biochem.* 159, 23-29.
- VOIT, R. and SCHNEIDER, H.-J. (1986b): Cloning and sequencing of *Eurypelma californicum* hemocyanin cDNA. In: *Invertebrate oxygen carriers* (LINZEN, B., ed.), 495-498. Springer-Verlag, Heidelberg.
- WAHL, G.M., STERN, M., and STARK, G.R. (1979): Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzyloxymethyl-paper and rapid hybridisation by using dextran sulfate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 3683-3687.
- WALLACE, R.B., JOHNSON, M.J., SUGGS, S.Y., MYOSHI, K., BHATT, R., and ITAKURA, K. (1981): A set of synthetic primers for DNA sequencing in the plasmid pBR322. *Gene* 16, 21-26.

- WATSON, C.J. and JACKSON, J.F. (1985): An alternative procedure for the synthesis of double-stranded cDNA for cloning in phage and plasmid vectors. In: DNA cloning. A practical approach (GLOVER, D.M., ed.), 79-88. IRL Press, Oxford.
- WICKENS, M. and STEFENSON, P. (1984): Role of the conserved AAUAAA sequence: Four AAUAAA point mutants prevent mRNA 3' end formation. *Science* 226, 1045-1051.
- WOOD, E.J. and BONAVENTURA, J. (1981): Identification of *Limulus* polyphemus haemocyanin messenger RNA. *Biochem J.* 196, 653-656.
- WOOD, E.J. and DIXON, R.A. (1985): Molecular cloning of complementary DNA from *Limulus* polyphemus. *Biochem. Soc. Trans.* 13, 261.
- WOOD, E.J. and SIGGENS, K.W. (1981): Studies on the biosynthesis of gastropod respiratory pigments. In: Invertebrate oxygen-binding proteins (LAMY, J. and LAMY, J., eds.), 825-832. Marcel Dekker, New York, Basel.
- WOOD, E.J., CORFIELD, G.C. and SIGGENS, K.W. (1981): Biosynthesis of haemocyanin in *Lymnaea stagnalis* L. (Gastropoda). *Comp. Biochem. Physiol.* 69B, 877-880.
- WOODS, D.E., MARKHAM, A.F., RICKER, A.T., GOLDBERGER, G., and COLTEN, H.R. (1982): Isolation of cDNA clones for the human complement protein factor B, a class III major histocompatibility complex gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 5661-5665.
- WOODS, D. (1984): Oligonucleotide Screening of cDNA libraries. *BRL FOCUS* 6, No. 3, 1-3.
- YANISH-PERRON, C., VIEIRA, J., and MESSING, J. (1985): Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33 103-119.

Lebenslauf

Vor- und Familienname:	Renate Voit
Geburtstag und -ort:	26. Oktober 1956, Fichtelberg
Eltern:	Oswald Voit und Hedwig Voit, geb. Hautmann
1963-1967	Besuch der Volksschule in Bayreuth
1967-1971	Besuch des Richard-Wagner-Gymnasiums in Bayreuth
1971-1976	Besuch des Sophie-Scholl-Gymnasiums in München
Juni 1976	Abitur
November 1977	Aufnahme des Studiums der Biologie an der Universität Erlangen
ab 1978	Studium der Biologie an der Universität München
Herbst 1982	Diplomprüfung
1983-1984	Diplomarbeit am Zoologischen Institut der Universität München unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Bernt Linzen mit dem Thema: "Hämocyanin-mRNA aus der Vogelspinne Eurypelma californicum: Translation in vitro und reverse Tran- skription".
April 1984	Beginn der vorliegenden Promotionsar- beit am Zoologischen Institut der Uni- versität München unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Bernt Linzen mit dem Thema: "Klonierung und Charakterisie- rung von cDNA für das Hämocyanin der Vogelspinne Eurypelma californicum".

